

Aus dem Institut für Anatomie II  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Geschäftsführende Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Charlotte von Gall

# **Die Wirkung von DEHP und Methimazol auf die Sertoli-Zellanzahl und Apoptose-Vorgänge im Rattenhoden**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

vorgelegt von

Jan Hendrik Busch

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. Haider

Correferent: Prof. Dr. Albers

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Fragestellung	
1.1.1 Quantifizierung der Sertolizell-Anzahl nach der Behandlung DEHP bzw. Methimazol	
1.1.2 Apoptotische Veränderungen im Hodengewebe nach Gabe von DEHP bzw. Methimazol	
2. Material und Methoden	7
2.1 Versuchstiere und ihre Behandlung mit dem Xenoöstrogen DEHP	
2.2 Immunhistochemischer Nachweis des Cleaved Caspase-3	
2.3 Immunhistochemischer Nachweis des Bcl2	
2.4 Versuchstiere und ihre Behandlung mit dem Thyreostatikum Methimazol	
2.5 Histologische PJS Färbung der Paraffinschnitte des Hodens	
2.6 Histologische Hämalaun-Eosin-Färbung	
2.7 Lichtmikroskopische Auswertung und Statistik	
3. Ergebnisse	17
3.1 DEHP-Versuch	
3.1.1 Befunde über die mit PJS + Hämalaun gefärbten Schnitte	
3.1.2 Befunderhebung über die Cleaved-Caspase-3-Immunreaktion	
3.1.3 Befunderhebung über die Bcl2-Immunreaktion	
3.1.4 Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit DEHP-behandelten Tiere und deren Kontrolltieren	
3.2 Methimazol-Versuch	42

3.2.1	Befunde über die mit PJS + Hämalaun gefärbten Schnitte	
3.2.2	Befunderhebung über die Cleaved-Caspase-3-Immunreaktion	
3.2.3	Befunderhebung über die Bcl2-Immunreaktion	
3.2.4	Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit Methimazol-behandelten Tiere und deren Kontrolltieren	
4.	Diskussion	49
4.1	Besprechung der Befunde über DEHP	
4.2	Besprechung der Befunde über Methimazol	
4.3	Schlussfolgerungen	
4.4	Ausblick	
5.	Literaturverzeichnis	57
6.	Zusammenfassung	65
7.	Anhang	66
8.	Danksagung	68
9.	Lebenslauf	69
10.	Eidesstattliche Versicherung	70

## 1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss eines Weichmachers (Di(2-ethylhexyl)phthalat ) und eines Thyreostatikums (Methimazol) auf einige Aspekte der Spermatogenese, speziell auf die Sertolizell-Anzahl und auf die Fortpflanzung im Hoden der Wistarratte.

### DEHP

In der modernen, technisierten Welt spielen Weichmacher eine wichtige Rolle. Phthalate sind solche Weichmacher und Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) ist ein häufiger Vertreter<sup>1</sup>. Es kommt in vielen kunststoffhaltigen Produkten vor, um deren Dehnbarkeit und Verarbeitbarkeit zu optimieren. So gelangen Phthalate in nahezu alle Bereiche des menschlichen Alltags: z.B. Baumaterialien, Möbel, Bodenbeläge, Tapeten, Lebensmittel sowie deren Verpackungen, Kosmetikartikel, Kinderspielzeug und Medizinprodukte .

Menschen sind als Verbraucher im täglichen Alltag Belastungen dieser Weichmacher ausgesetzt.

Mehrere Studien weisen auf eine kanzerogene Wirkung des DEHP hin. Es existieren bereits zahlreiche Untersuchungen in Zusammenhang mit Tumoren, z.B. der Leber oder Leukämie.

Es wird diskutiert, ob sie teratogen sind (*u.a. Mahood et al. 2005; Culty et al. 2008*) oder zu Entwicklungsverzögerungen führen.

Mittlerweile ist die störende Beeinflussung des Hormonhaushaltes durch Xenoöstrogene bzw. „Hormon Disruptoren“, auch endokrine Disruptoren genannt, unstrittig, da v.a. endokrine Stoffwechselfvorgänge betroffen sind.

---

<sup>1</sup> DEHP: UMWELTBUNDESAMT (UBA). Pressestelle (Hg.) (2007): Phthalate – nützliche Weichmacher mit den unerwünschten Eigenschaften. Empfehlung des Umweltbundesamts zum schrittweisen Ersatz. (Presse-Informationen 003/2007, 1-24, hier S. 6 und S. 16-18 (Anhang 1). Vgl. auch: „Der bislang wichtigste POHTHalat-Weichmacher DEHP ist aufgrund [seiner] Freisetzen in allen Umweltmedien präsent.“ (UMWELTBUNDESAMT (UBA) (2003): Leitfaden zur Anwendung umweltverträglicher Stoffe für die Hersteller und gewerblichen Anwender gewässerrelevanter Chemischer Produkte. Teil 5: Hinweise zur Substitution gefährlicher Stoffe. 5.1 Weichmacher, S. 4. – „In Deutschland wurden im Jahre 2001 etwa 62.000 t DEHP verbraucht. Die Verwendungsbereiche und Freisetzen in Relation zum Marktvolumen sind vergleichbar mit denen des EU-Marktes [...]“ (Ibid., S. 5).

DEHP ist dieser Stoffgruppe zuzuordnen. Der Wirkmechanismus dieser endokrinen Disruptoren ist unterschiedlich. Ein Teil bindet an Hormonrezeptoren und löst dadurch eine hormonähnliche Wirkung aus. Ein anderer Teil blockiert Hormonrezeptoren und inhibiert die eigentlich Hormonwirkung.

Der Metabolismus von Hormonen wird v.a. durch Aktivierung und Antagonisierung von Rezeptoren in Hypothalamus, Fettgewebe, Leber und Gonaden beeinflusst. So stehen endokrine Disruptoren im Verdacht, die Ausprägung von Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus und Adipositas ungünstig zu beeinflussen ( *Migliarini et al. 2011*).

Speziell die Wirkung von DEHP als endokriner Disruptor auf Testosteron ist in diesem Zusammenhang interessant.

Testosteron ist ein Hormon, welches in den Leydigzellen auf Anregung durch das Hormon LH ( Luteinisierendes Hormon) gebildet und dessen Spiegel im Blut über komplexe Rückkoppelungsvorgänge zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Leydigzellen reguliert wird und welches den Spermatogenesevorgang steuert. Testosteron fördert die mitotische und meiotische Teilung von Spermatogonien und Spermatozyten I. Ordnung.

In den voneinander nicht unabhängigen Rückkoppelungsvorgängen spielt auch FSH ( Follikelstimulierendes Hormon ), welches im Hypophysenvorderlappen produziert wird, eine wichtige Rolle für die Ernährung der Spermatozoen, die Produktion von androgenbindenden Proteinen und von Tubulusflüssigkeit als Medium zur Bewegung der Spermien. FSH ist als Initiator der Spermatogenese zu sehen und bewirkt die Differenzierung von Spermatiden zu Spermatozoen.

Rückkoppelungshemmung von Hypothalamus und Hypophyse durch Testosteron, Östradiol und Inhibin aus: *Löffler und Petrides (2003)*.

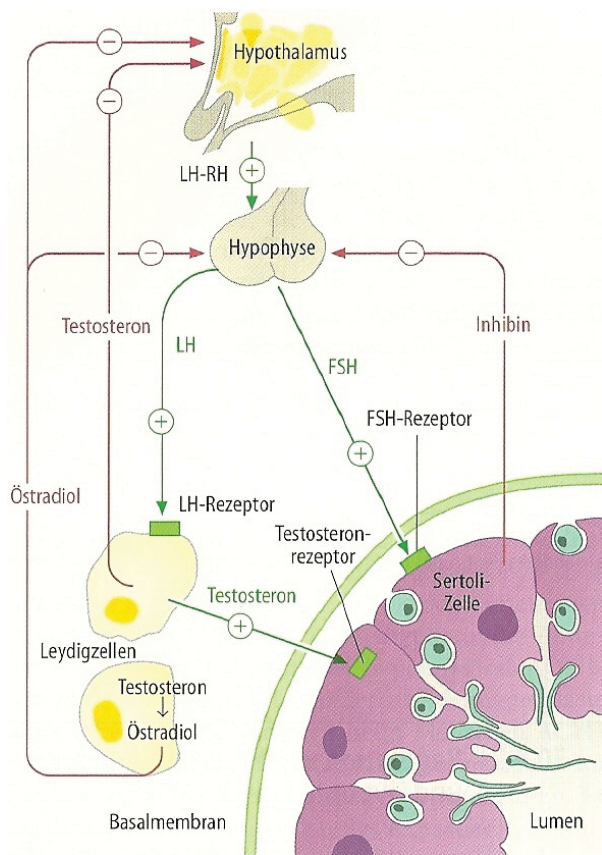


Abb. 1 zeigt u.a., dass das vom Hypothalamus produzierte LH-RH (luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon) den Hypophysenvorderlappen zu Freisetzung von LH (luteinisierendes Hormon) stimuliert, welches über den LH-Rezeptor auf der Membran der Leydigzellen in diesen die Produktion von Testosteron bewirkt. Testosteron stimuliert die Testosteronrezeptoren der Sertolizellen, wirkt aber gleichzeitig über negative Rückkoppelung auf den Hypothalamus . Weiter führt LH-RH im Hypophysenvorderlappen zu Freisetzung von FSH, welches direkt die FSH-Rezeptoren der Sertolizellen stimuliert.

Es scheint, dass das DEHP die Synthese, die Sekretion und die Funktion beeinträchtigt und dadurch die männliche Fortpflanzung beeinflusst (*Park et al* Es existieren bereits zahlreiche weitere Studien, die auf eine negative Beeinflussung von DEHP auf die Fertilität hinweisen.

D.h., es stellt sich die Frage, ob sie die Reproduktionsfähigkeit und die Entwicklung beeinflussen (*Park et al., 2002; Welsh et al., 2008*).

Auch sind durch DEHP-Einfluss Veränderungen in der Ausbildung und Entwicklung von männlichen Geschlechtsorganen beschrieben. (*Wolf et al., 2000; Scott et al., 2008* )

In diesem Zusammenhang ist das TDS ( Testicular dysgenesis syndrome ) zu nennen, welches sich aus vier Symptomen: Hypospadie, verminderte

Spermienanzahl (< 20 Millionen/ml) bzw. Infertilität, testikuläre Germzelltumore, Kryptorchismus zusammensetzt, die nicht spezifisch für TDS sind, sondern auch singuläre Krankheitsbilder sind, aber in Kombination als TDS beschrieben werden. Missbildung des Hodens in der frühen Fetalphase können zur Ausbildung des TDS führen. Im Tierexperiment ist bereits mehrfach bewiesen worden, dass durch erhöhte Gaben von DEHP TDS bzw. TDS-ähnliche Symptome induziert werden können ( *Welsh et al., 2008* ).

Nach der Aufnahme, hauptsächlich über die Nahrung, sind Metabolite von Phthalaten bei fast jedem Menschen in Blut und Urin nachweisbar ( *u.a. Aylward et al., 2009* ).

Laut WHO nähert sich die Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit der Männer durch die Phthalate in Deutschland einem Wert, der als "kritisch" eingestuft wird ( *u.a. Meeker et al., 2009* ). Weiter wird diskutiert, ob schon der Fetus während der Schwangerschaft möglichen Belastungen durch einen gestörten Hormonhaushalt der Mutter – ausgelöst durch Weichmacher – ausgesetzt ist ( *Swan et al., 2009; Drake et al., 2009* ). In der Schwangerschaft gelangen die Weichmacher über den mütterlichen in den kindlichen Kreislauf. Hier stören sie die Entwicklung in einer ganz sensiblen Lebensphase und schädigen so das Neugeborene. Die Folgen können sich auch erst nach Jahrzehnten, z. B. durch Unfruchtbarkeit bemerkbar machen ( *Hauser et al., 2007; Wirth et al., 2008* ).

Das Umweltbundesamt in Deutschland weist wiederholt auf diese Risiken durch den Kontakt mit Weichmachern hin ( *Pressestelle des Umwelt Bundes Amtes (Hg.) (2007): Phthalate – die nützlichen Weichmacher mit den unerwünschten Eigenschaften S. 1-24* ).

Bisher sind schon Arbeiten zu den Metabolisierungsvorgängen der Weichmacher speziell DEHP, veröffentlicht, in welchen auf Halbwertszeiten und Metabolisierungswege eingegangen wird.

Aktuell rücken Weichmacher und ihre noch nicht bis ins letzte Detail erforschte Wirkung auf den menschlichen Organismus in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Es fehlt zum Teil an allgemeingültigen Richtlinien der Bundesrepublik Deutschland bzw. der Europäischen Union; bestehende Vorgaben müssten der aktuellen Forschungslage angepasst werden.



## **Methimazol**

Der andere Stoff, dessen Auswirkung auf die Sertoli-Zellanzahl untersucht werden soll, ist Methimazol.

Hierbei handelt es sich um ein Thyreostatikum, welches bei Hyperthyreose eingesetzt wird. Es wirkt hemmend auf die Bindung von Jodid aus dem Blutplasma an die Thyreoperoxidase und inhibiert so die Synthese von Thyroxin (*Thomaz et al., 2009*).

Die Hormone Thyroxin (T4) und Trijodthyronin (T3) werden in der Schilddrüse gebildet, und ihre Biosynthese unterliegt einer negativen Rückkoppelungsachse welche von Hypothalamus und Hypophyse gebildet wird. Über die Ausschüttung von TRH ( Thyrotropin releasing hormon ) stimuliert oder über Somatostatin inhibiert der Hypothalamus die Ausschüttung von TSH ( Thyroidea stimulierendes Hormon ) aus der Hypophyse. Die TSH-Sekretion bewirkt in der Schilddrüse die Bildung von T3 und T4, welche sowohl auf die Hypophyse als auch auf den Hypothalamus über negative Rückkoppelung wirken ( *Löffler und Petrides, 2003*).

Die Schilddrüsenhormone T3 und T4 haben zahlreiche Wirkungen auf den Stoffwechsel ( Glucose und Lipide ), den O<sub>2</sub>-Verbrauch, die Hirnentwicklung, das kardiovaskuläre System, das Wachstum und die Differenzierung von Zellen auch bei der Ausbildung des Reproduktionstraktes.

Es sind eine Anzahl von Nebenwirkungen von Methimazol u.a. auf die Fortpflanzung bekannt. In der Literatur existieren hierzu z. T. nichteinheitliche Angaben. Bei leichter neonataler Hypothyreose wurde eine gesteigerte Proliferation der Leydigzellen beobachtet ( *Cristovo et al., 2002* ).

Als postnatale Wirkung wurden Schilddrüsenhormonen ein Einfluss auf die Reifung der Sertolizellen zugesprochen, wo sie die Proliferationsdauer und Anzahl der Sertolizellen zu beeinflussen ( *Palermo et al., 1989 und Buzzard et al., 2003* ). Weiter wurden während der Behandlung morphologische Veränderungen bei der Ausbildung des Reproduktionstraktes beschrieben.

Interessant wäre es, die eventuelle Wirkung auf die Spermatogenese und indirekt damit auf die Reproduktionsfähigkeit genauer zu untersuchen (vgl. *Kollmer , 2008* ).

Da es sich bei Methimazol um ein häufig verwendetes Medikament handelt, ist es angebracht, die möglichen Nebenwirkungen auf die Spermatogenese genauer zu

untersuchen, weil zahlreiche Befunde darauf hindeuten, dass die Schilddrüsenhormone die Differenzierung der Leydigzellen und Sertolizellen beeinflussen und sogar verzögern können.

## **1.1 Fragestellung**

Im Rahmen eines umfangreichen Forschungsprojektes wurden die Wirkung von DEHP und von Methimazol auf die testikulären Zellen der Wisterratte mit Hilfe von histologischen, immunhistochemischen und morphometrischen Methoden untersucht. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einem Teilaspekt dieses Projektes. Die folgenden zwei Aspekte sollen hierbei die Schwerpunkte bilden (*Mendis-Handagama et al., 1998*).

### **1. Quantifizierung der Sertolizell-Anzahl nach der Behandlung mit DEHP bzw. mit Methimazol**

Die Anzahl der Sertolizellen pro Hoden-Kanälchen-Querschnitt ist ein zentraler Parameter für die Beurteilung der Qualität der Spermatogenese ( *vgl. Orth et al., 1988; De Schepper, 2009; Guminska et al., 2007; Mahmoud et al., 2005*). Die Anzahl der Sertolizellen im Hoden soll an Hand der Paraffinschnitte ( Färbung: PJS+Hämalaun) ermittelt werden.

### **2. Apoptotische Veränderungen im Hodengewebe nach Gabe von DEHP bzw. Methimazol**

Beeinflusst die Behandlung mit DEHP bzw. mit Methimazol die apoptotischen Vorgänge im Hoden? Die Frage soll mit Hilfe der immunhistochemischen Reaktion von Bcl2 und Cleaved Caspase-3 näher untersucht werden.

## **2. Material und Methoden**

Die Experimente (Tierhaltung, Behandlung der Versuchstiere) wurden im Department of Zoology (Dr. Y. Okdah), Faculty of Science an der Menufiya University „Shebin Elkom“ in Ägypten durchgeführt.

Die histologischen sowie immunhistochemischen Studien und statistischen Erhebungen wurden am Institut für Anatomie II der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf durchgeführt.

### **2.1 Versuchstiere und ihre Behandlung mit dem Xenoöstrogen DEHP**

#### **2.1.1 Durchführung des Experiments mit dem DEHP**

Für das Experiment wurden 20 Tage alte Albinoratten (*Rattus norvegicus*) verwendet. Die Ratten wurden in sechs Gruppen eingeteilt, von denen jeweils drei Gruppen - präpuberale bzw. puberale Phase der Fortpflanzung - mit DEHP behandelt wurden, drei dienten unbehandelt als Kontrollgruppen.

Die erste Gruppe der behandelten Tiere wurde *zehn Tage*, die zweite *zwanzig Tage*, die dritte *dreißeig Tage* behandelt.

Während die Ratten der Behandlungsgruppe 200 mg / kg Körpergewicht DEHP, suspendiert in 0,5ml Maisöl, erhielten, wurden die Ratten der Kontrollgruppe mit 0,5 ml Maisöl gefüttert.

Sowohl DEHP als auch Maisöl wurden oral mit einer Gavage (= Schlundsonde) täglich zwischen 10.00 und 11.00 Uhr vormittags verabreicht.

Vierundzwanzig Stunden nach dem Erhalt der letzten Dosis wurden die Ratten getötet und die Hoden entnommen.

#### **2.1.2 Histologie**

Das Hodengewebe ist in Bouin fixiert und in Paraffin eingebettet worden.

Anschließend wurden von den Paraffin-Blöcken 20 jeweils 5 µm dicke Schnitte gefertigt.

Für die Untersuchung und die damit verbundene Anfärbung wurde aus den 20 Schnitten nach unserem Schema folgende Schnitte ausgewählt:

4     PJS

7     Cleaved Caspase-3 + HE

- 8 Cleaved Caspase-3
- 10-11 Bcl2
- 13 PJS
- 15 Cleaved Caspase-3 + HE
- 16 Cleaved Caspase-3
- 18-19 Bcl2

Die übrigen Schnitte fanden in der Auswertung keine Berücksichtigung.

Bei den PJS-gefärbten Schnitten wurde die linke Hodenhälfte nach einem bestimmten Schema einheitlich gewählt und in dieser wurden bei 25 Tubuli seminiferi nach „Mäander –Schema“ ( versetzter Strecke innerhalb eines Schnittes ) ausgewählt, um die Anzahl der Sertoli-Zellkerne pro Kanälchen zu bestimmen.

Auch bei den Schnitten die mit Caspase3-AK gefärbt wurden, sind in der linken Hodenhälfte jeweils 25 Tubuli seminiferi nach gehabtem Schema ausgewählt worden. Dabei wurde die Beobachtung konzentriert auf den allgemeinen Eindruck der Zellen, die mögliche positive Reaktion und das Vorhandensein von Zellbestandteilen.

Die Bcl2 Schnitte wurden im Hinblick auf die Zellstadien der Spermatogenese untersucht. Hierzu wurden - ausgehend von Leblond / Clermont (1952) und deren Einteilung in die vierzehn Stadien der Spermatogenese - sieben Stadienpaare gebildet, in den linken Hodenhälften aufgesucht, gezählt und ausgewertet.

Einteilung der Spermatogenesestadien nach Leblond / Clermont ( 1952 )

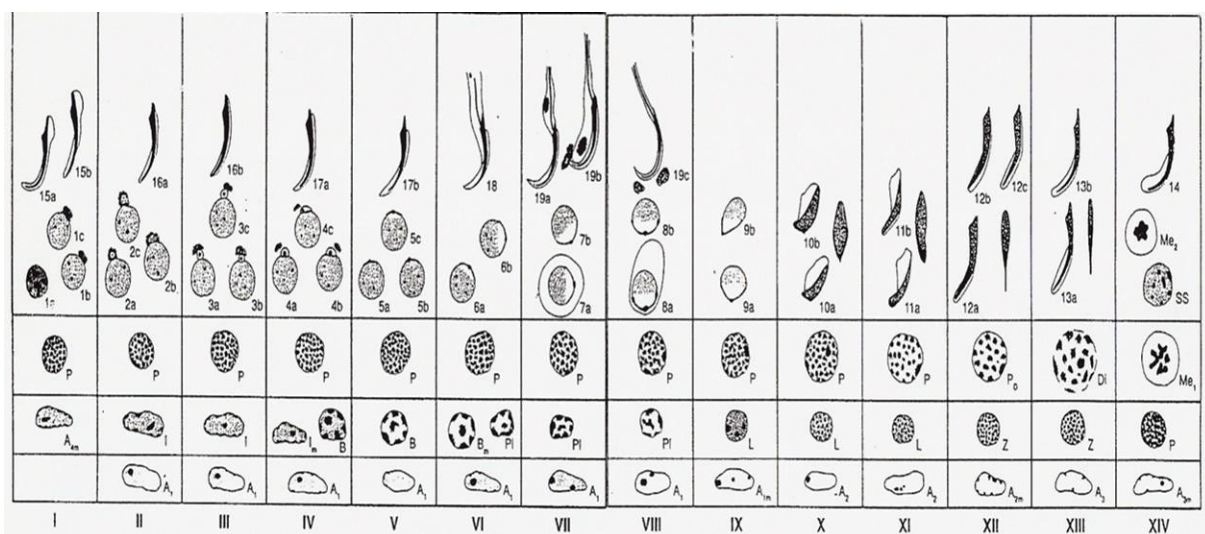


Abb.2 Diese Übersicht zeigt die Einteilung der Organisation der Spermatogenese-Zellen, von Leblond / Clermont ( 1952 ) in 14 Stadien beschrieben.

Die Einzelheiten der immunhistochemischen Reaktionen von CleavedCaspase-3 und von Bcl2 werden nun ausführlich in den Abschnitten 2.2 und 2.3 dargestellt.

## **2.2 Immunhistochemischer Nachweis des CleavedCaspase-3**

Folgende Arbeitsschritte zum Immunhistochemischen Nachweis mit Cleaved Caspase-3 (monoclonal aus Kaninchen: CleavedCaspase-3, Nr. 9664 Fa. Cell Signalling, USA, s. Datenblatt unter Anhang 1, S. 66) wurden durchgeführt :

a) Entparaffinierung im Brutschrank bei 60°C für 20 Min., danach ohne Abkühlen in Xylol (10 Min), im Anschluss absteigende Alkoholreihe (je 2 Min) und aqua dest. (=a.d.)

Die Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur.

b) Die Schnitte wurden solange in 70% Alkohol belassen, bis der Dampfgerar betriebsbereit war.

c) Vorbereitung im Dampfgerar:

- In ein 250 ml Becherglas wurden ca. 180 ml Zitronensäure-Na-Zitratpuffer <sup>1</sup> als Demaskierungspuffer mit pH 6,0 eingefüllt.

- Mit Hilfe einer Thermometersonde wurde nach ca. 20 Min eine Temperatur von 95°C erreicht.

Die Schnitte aus dem 70% Alkohol wurden in a.d. gebracht, in einen in a.d. befindlichen Plastikständer eingeräumt, um das Austrocknen der Schnitte zu verhindern.

- Der Plastikständer mit den Schnitten wurde in die heiße Demaskierungslösung geben.
- Sobald wieder eine Temperatur von 95°C erreicht war, verblieben die Schnitte 10 Min im Dampfgerar.
- Danach wurde das Becherglas mit den Schnitten 30 Min zum Abkühlen auf den Labortisch gestellt.
- Nach völligem Abkühlen der Schnitte wurden sie für 2 mal je 5 Min in a.d. gebracht.

d) Die Schnitte wurden großzügig mit einem Dako Pen umkreist. Dabei wurde darauf

geachtet, dass sie nicht austrockneten.

e) Zum Blockieren der endogenen Peroxidase :

- wurden die umkreisten Schnitte waagrecht in Diakästen gelegt (max. 8 Schnitte), deren Böden mit a.d. leicht bedeckt waren. So entstand jeweils eine feuchte Kammer.
- Danach wurde 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid) auf die Schnitte geträufelt.
- Die Schnitte wurden für 10 Min in den Kästen belassen.

f) Waschen in a.d.:

Die Schnitte wurden einzeln aus dem Diakasten entnommen, mit einer Spritzflasche mit a.d. abgespült und danach in eine Küvette mit a.d. gestellt. Innerhalb von 15min wurde das a.d. 2 mal erneuert.

g) Waschen mit PBST<sup>2</sup> (phosphatgepufferte NaCl - Lösung + Tween 20) für 5 Min

h) Blockierung unspezifischer Bindungen mit:

- 5% Ziegenserum  
die Schnitte wurden einzeln aus der Küvette genommen und in Diakasten gelegt und sofort mittels einer Plastikpipette Ziegenserum beträufelt, Deckel wurde für 60 Min aufgelegt

i) Aufbringen des Primärantikörper (Cleaved Caspase-3)

- Der Antikörper Cleaved Caspase-3 wurde in einer *Konzentration von 1:75* (mit 5% Ziegenserum verdünnt) aufgebracht (siehe Datenblatt Cleaved Caspase-3).
- Das Ziegenserum wurde abgeschleudert und Cleaved Caspase-3 wurde in einer Konzentration von 1:75 (mit 5% Ziegenserum verdünnt) luftblasenfrei aufgeträufelt.
- Die Diakästen wurden geschlossen waagrecht in den Kühlschrank gestellt und 16 Stunden lang inkubiert.
- Da bei jeder Immunreaktion eine Negativkontrolle mitgeführt werden muss und diese alle Arbeitsschritte durchlaufen muss, wurde der Primär-AK in diesem Fall durch Ziegenserum ersetzt.

j) Waschen mit PBST

mittels einer Spritzflasche mit Puffer wurden die Schnitte abgespült  
danach wurden sie in eine Küvette mit Puffer gestellt 3 mal je 5 Min

k) Envision Rabbit (Fa. Dako) für 30 Min

- Dieses konjugierte Polymer, d.h. Sekundär AK sowie Peroxidase in einer Lösg., wurde aufgeträufelt, die Schnitte in Diakästen gelegt und bei geschlossenem Deckel und Raumtemperatur inkubiert.

l) Waschen mit PBST

Mittels einer Spritzflasche mit Puffer wurden die Schnitte abgespült  
danach wurden sie in eine Küvette mit Puffer gestellt 3 mal je 5 Min.

m) Aufbringen von Chromogen Lösung als Farbgeber

- Vorbereitete DAB Lösg.<sup>3</sup> wurde auf die Schnitte geben und für 10 Min belassen

n) Waschen mit a.d.

Die Schnitte wurden mit a.d. aus Spritzflasche abgespült und 5 Min in eine mit a.d. gefüllte Küvette gestellt.

o) Optionale Kernfärbung mit Hämalaun für 30 Sek. mit anschließenden Wässern der Schnitte ( 5 Min )

p) Entwässern der Schnitte durch aufsteigende Alkoholreihe und Xylol je 2 Min

q) Abschließend Eindecken mit DePeX

---

<sup>1</sup>Demaskierungspuffer: Zitronensäure-Zitratpuffer, pH 6,0

Dieser Puffer dient dazu, die im Gewebe vorhandenen Antigene aufzuspalten, damit sie mittels der Antigen-Antikörper-Methode nachgewiesen werden können. Diese Demaskierung ist häufig bei Verwendung monoclonaler AK sowie bei Paraffinschnitten erforderlich. Die Demaskierungspuffer können sauer, alkalisch oder stark alkalisch sein. Die alkalischen Puffer werden vor allem dann verwendet, wenn es sehr schwierig ist, eine Immunreaktion darzustellen. Leider können die Schnitte bei Verwendung alkalischer Puffer Schaden erleiden, d.h. sie schwimmen

völlig oder teilweise ab. Deshalb war es ratsam, mehrere Schnitte zu verwenden.  
Für 0,01 M Zitronensäure-Na-Zitratpuffer mit pH 6,0 werden 1,0505 g Zitronensäure Monohydrat (MG 210,1) in 500 ml a.d. gelöst. 2,9410 g Natriumzitrat x 2H<sub>2</sub>O wird in 1000 ml a.d. gelöst. Anschließend werden beide Lösungen gemischt.

<sup>2</sup> PBST mit pH 7,4 10fach konzentriert ( =phosphatgepufferte NaCl - Lösung + Tween 20 )

Für PBS:

80,0 g NaCl

2,0 g KCl

14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Monobase)

Diese Substanzen werden in 500 ml a.d. gelöst und dann mit a.d. auf 1000 ml aufgefüllt. Der pH Wert wird auf 7,4 eingestellt.

Für den Gebrauch als Spülpuffer werden 100 ml PBS mit 900 ml a.d. und 1 ml Tween 20 gemischt.

Der pH wird bei Raumtemperatur auf 7,4 eingestellt.

<sup>3</sup>DAB Chromogen

DAB ist ein Farbgeber bei Immunreaktionen und ergibt ein braunes Alkohol - und Xylolunlösliches Farbprodukt.

Möglicherweise ist DAB cancerogen. Das Reagenz ist zudem nicht lichtbeständig und muss lichtdicht gelagert werden.

Die zu diesen Versuchen verwendeten DAB-Tabletten müssen im Kühlschrank gelagert werden.

Zur Herstellung von 10 ml DAB werden benötigt:

- 10ml Waschpuffer ( s. PBST )
- 1 Tabl. DAB

Beides wurde gemischt und dann 10 Min per Rührfisch gerührt.

Zur Aktivierung der DAB-Lösung wurden für 2 ml DAB 15 µl 3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> benötigt.



### 2.3 Immunhistochemischer Nachweis des BCL2

Folgende Arbeitsschritte zum immunhistochemischen Nachweis des BCL2 (monoclonal aus Maus, Fa. Dako, Nr. M0887, Datenblatt im Anhang) waren nötig: ( Es folgt lediglich die Erläuterung der Arbeitsschritte und der Veränderungen im Versuchablauf, die sich im Vergleich zum Nachweis mit Caspase 3 unterscheiden, die nicht erwähnten Schritte waren gleich, s. Datenblatt unter Anhang 2 S. 67).

c) Vorbereitung im Dampfgerar:

- In ein 250 ml Becherglas wurden ca. 180 ml Retrievalpuffer (10mM/l TRIS-Puffer, 1mM/l EDTA, pH 9,0) eingefüllt.
- Sobald wieder eine Temperatur von 95°C erreicht war, verblieben die Schnitte 20 Min im Dampfgerar.

f) Waschen in a.d.:

Die Schnitte wurden einzeln aus dem Diakasten entnommen, mit einer Spritzflasche mit a.d. abgespült und danach in eine Küvette mit a.d. gestellt. Innerhalb von 10min wurde das a.d. 1 mal erneuert.

g) Waschen mit TBS (dreifachgepufferte NaCl - Lösung 0,05 M, 7,4pH ) für 5 Min

h) Aufbringen des Primärantikörper (Monoclonal Mouse Anti-Human BCL2 Oncoprotein)

- Der Puffer wurde abgeschleudert und wurde in einer *Konzentration von 1:50* (mit Dako Diluent Nr. S0809 verdünnt) luftblasenfrei aufgeträufelt.
- Die Diakästen wurden geschlossen waagrecht in den Kühlschrank gestellt und 16 Stunden lang inkubiert
- Da bei jeder Immunreaktion eine Negativkontrolle mitgeführt werden muss und diese alle Arbeitsschritte durchlaufen muss, wurde der Primär AK in diesem Fall durch Dako Diluent Nr. S0809 ersetzt.

i) Waschen mit TBS

Mittels einer Spritzflasche mit Puffer wurden die Schnitte abgespült danach wurden sie in eine Küvette mit Puffer gestellt 2 mal je 5 Min.

j) Envision Dual Link (Fa. Dako, für mono- und polyklonale AK ) für 30 Min dieses konjugierte Polymer, d.h. Sekundär AK sowie Peroxidase in einer Lösg. wurde aufgeträufelt, die Schnitte in Diakästen gelegt und bei geschlossenem Deckel und Raumtemperatur inkubiert.

k) Waschen mit TBS

mittels einer Spritzflasche mit Puffer wurden die Schnitte abgespült  
danach wurden sie in eine Küvette mit Puffer gestellt 2 mal je 5 Min

## **2.4 Versuchstiere und ihre Behandlung mit dem Thyreostatikum Methimazol**

### **2.4.1 Durchführung des Experiments mit Methimazol**

Drei Monate alte männliche Albinoratten – mit einer adulten Phase der Fortpflanzung – sind für dieses Experiment gewählt worden.

Dazu sind die Tiere in 2 Gruppen, je 5 Tieren eingeteilt worden, die eine wurde mit dem Antithyroid Methimazol = MMI behandelt, welches sich über 30 Tage in einer Konzentration von 0,1% in ihrem Wasser befand, während die andere Kontrolltier-Gruppe mit normalem Tierfutter und Wasser versorgt wurde.

Vierundzwanzig Stunden nach der letzten Versorgung, wurden die Ratten getötet, die Hoden entnommen, in Bouin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden Schnittserien mit 5 µm dicken Schnitten erstellt.

### **2.4.2 Histologie und Histochemie**

Von den Hoden wurden ebenfalls 20 Schnitte je Hoden angefertigt. Diese sind nach dem gleichen Schema ( s. 2.1.3) wie auch zuvor die DEHP-Schnitte ausgewählt, gefärbt bzw. den immunhistochemischen Reaktionen ausgesetzt worden.

Die im Methimazol-Versuch verwandten Methoden entsprechen den unter 2.1.1 und z. T. unter 2.1.3.

Es stand bei diesen beiden Versuchstiergruppen in der PJS-Färbung, der Caspase3- und der Bcl2- Antikörper-Reaktion eine Beobachtung der Aktivität und Ausprägung der Immunreaktion im Vordergrund.

### **2.4.3 Statistik**

Die bei der Auswertung der Schnitte erhobenen Daten sind mehrfach mit dem Student-T-Test überprüft worden. Hierbei war  $P < 0,05$  und somit signifikant.

### **2.5 Histologische PJS Färbung der Paraffinschnitte des Hodens**

5 $\mu$  dicke Paraffinschnitte wurden nach den folgenden Methodenrezepten behandelt.

- 1 - Entplasten der Schnitte in Xylol, absteigender Alkoholreihe und Aqua dest.
- 2 - 3% Essigsäure-Lösung für 3 min
- 3 - Färben in Alcianblau-Lösung 1% für 2 min
- 4 - Wässern in fl. Leitungswasser für 5 min
- 5 - Oxidieren in 0,5 % wässriger Perjodsäure, 30 min lang
- 6 - Wässern in fl. Leitungswasser für 5 min
- 7 - Einstellen in Schiffisches Reagenz für 30 min
- 8 - Wässern in fl. Leitungswasser für 10 min
- 9 - Waschen in Sulfitwasser 2 mal 3 min
- 10 - Wässern in fl. Leitungswasser für 10 min
- 11 - Kernfärbung mit Hämalaun nach Meyer 10 min
- 12 - Wässern in fl. Leitungswasser für 10 min
- 13 - Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe
- 14 - Eindecken mit DePex

### **2.6 Histologische Hämalaun-Eosin-Färbung der Hodenschnitte**

Um eine kontrastreichere Kernfärbung zu erhalten wurden 2 Schnitte – wie im Schema unter 2.1.3 darstellt – aus der Schnittserien jedes Tieres zusätzlich mit HE gefärbt.

### **2.7 Lichtmikroskopische Auswertung und Statistik**

Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte an einem Mikroskop der Firma Leitz Köln. Hierbei wurden die entsprechenden in den Schnitten sichtbaren Zellen ausgezählt und ausgewertet. Hauptsächlich konnten Sertoli- und Leydigzellen, Fibroblasten sowie charakteristische Zellen der Spermatogenese, die deren Stadienidentifizierung diente, dargestellt werden. Es wurden zwei Schnitte pro Hoden, von vier bzw. sechs Tieren einer Gruppe verwendet. In jedem Schnitt wurden 25 Tubuli berücksichtigt. Mittelwert und + / - Standardabweichung wurden statistisch bestimmt. Die Signifikanz wurde mit dem studentischen T-Test ermittelt und war  $p < 0,05$  und für signifikant

erachtet. Die bei der Auswertung der Schnitte erhobenen Daten sind mehrfach mit dem Student-T-Test überprüft worden. Hierbei war  $P < 0,05$  und somit signifikant.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 DEHP-Versuch

##### 3.1.1 Befunde über die mit PJS + Hämalan gefärbten Schnitte

Es fällt schon im rein optischen Vergleich der beiden Schnitte auf, dass die mit DEHP behandelten Schnitte des Hodens im Querdurchmesser kleiner sind als die unbehandelten. (siehe Tab. 1)

Alter Tiere in Tagen	30	40	50
Kontrolltiere	3,08	5,21	6,72
DEHP behandelte Tiere	2,92	4,47	5,21

Tab. 1 Querdurchmesser des Hodenschnittes (mm), (n = 32 Tiere)

##### 3.1.1.1 Befunde über das Vorkommen der Sertoli-Zellen (Abb.3 - 5)

Die Abbildungen 3 und 5 fassen die Befunde über die Quantifizierung der Sertoli-Zellen im Paraffinschnitt ( Färbung PJS+ HE ) des Testes der Versuchstiere zusammen.

Bei der Auswertung der Messdaten über die Anzahl der Sertoli-Zellen zeigt sich im Vergleich der behandelten mit den unbehandelten Tiere mit zunehmendem Alter der Versuchstiergruppen eine steigende Ausprägung der Sertoli-Zell-Anzahl.

Dies wird deutlich durch den Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Gruppen.

Bei den 30 Tage alten Tieren liegt unbehandelt der Mittelwert der Sertoli-Zellen bei 7,5 im Vergleich zu behandelt bei 6,6.

Die Ausprägung bei den 40 Tage alten Tieren beträgt unbehandelt 12,3 zu behandelt 9.

In der am weitesten entwickelten Gruppe - 50 Tage – liegen die Mittelwerte unbehandelt 13,7 zu behandelt 10,1. Zum besseren Überblick sei noch mal auf Abb.3 verwiesen.

DEHP- Versuch Mittelwert der einzelnen Gruppen

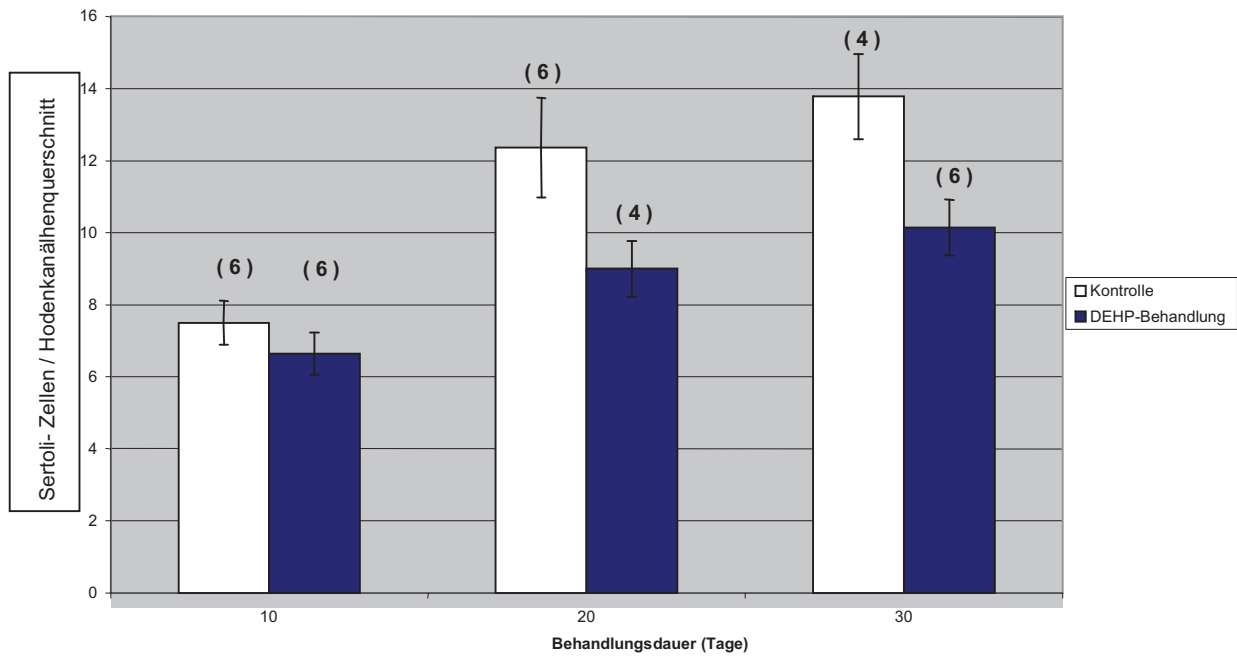


Abb. 3

Diese Graphik zeigt einen Unterschied der Ausprägung der Sertoli-Zell-Verteilung zwischen den Versuchstier-Gruppen. Die Anzahl der Sertoli-Zellen bei der Kontrollgruppe steigt mit zunehmendem Alter deutlich an. Nach der DEHP-Behandlung nimmt die Sertoli-Zellzahl in allen drei Graphen ab. Die ( Zahl ) über den Säulen, gibt die Anzahl der Tiere an. Durchschnitt +/- Standardabweichung. Alle Werte sind signifikant ( $p < 0,05$ ).

Mittelwert der Kontrolltiere 50 Tage alt

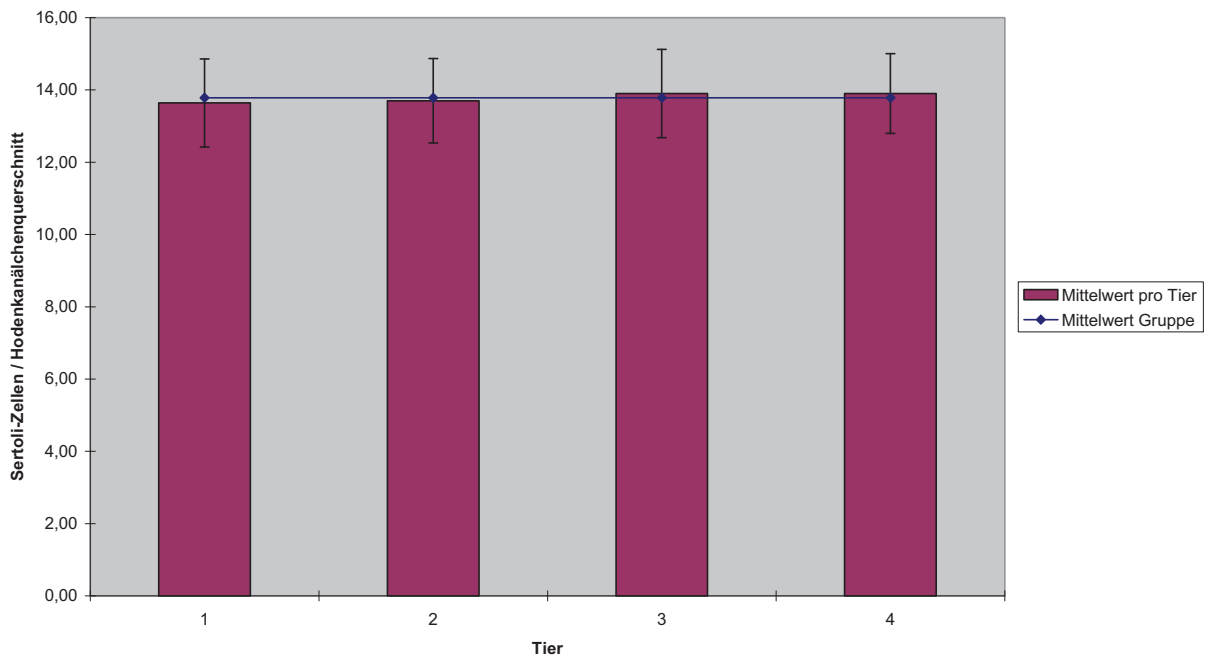


Abb. 4

Mittelwert der Kontrolltiere, 50 Tage alt. Auf der Abszisse sind die Kontrolltiere und auf der Ordinate ist der Mittelwert der Anzahl der Sertoli-Zellen im Hodenkanälchenquerschnitt dargestellt. Zur Bestimmung dieses Mittelwertes wurden mindestens 25 Kanälchen pro linker Hodenhälfte eines Tieres neanderförmig ausgewählt.

Bei den vier Tieren der Kontrollgruppe wird eine gleichmäßige Verteilung der Sertoli-Zell Ausprägung ersichtlich.

Der kleinste Wert beträgt 13,64 und der größte 13,9.

Für alle Werte wurde die Standardabweichung berechnet. Alle Werte sind signifikant ( $p < 0,05$ ).

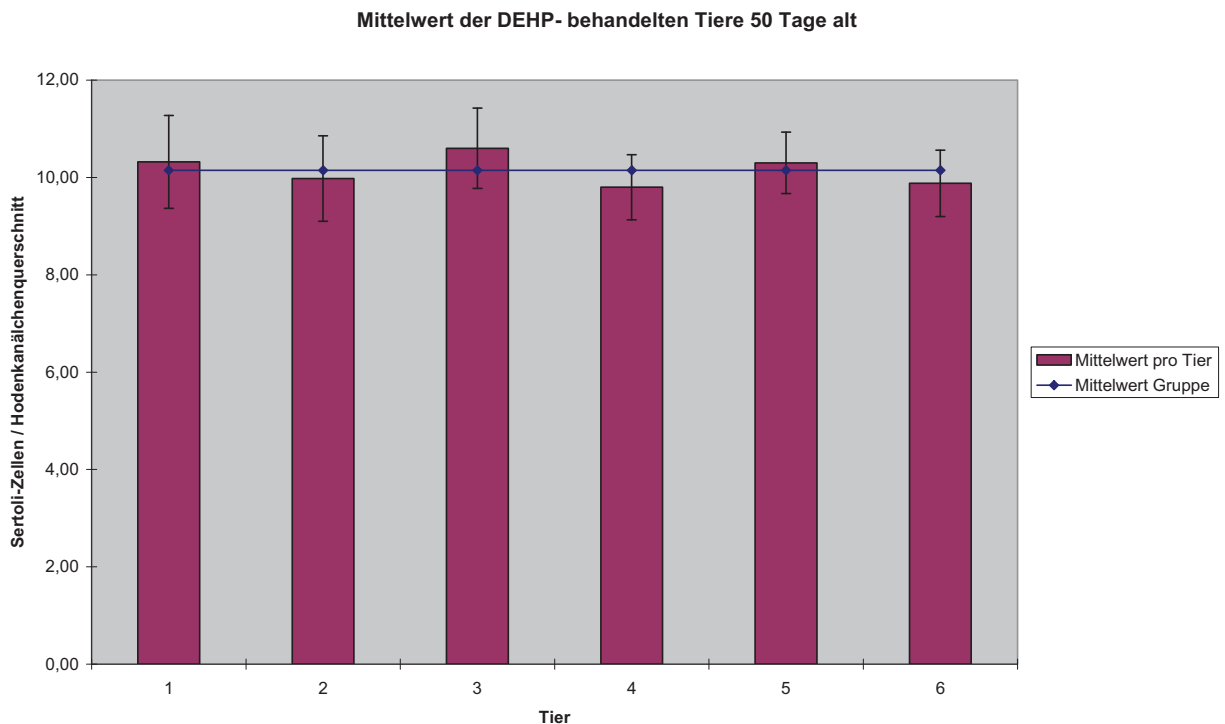


Abb. 5

Mittelwert der DEHP – behandelten Tiere, 50 Tage alt. Auf der Abszisse sind die behandelten Tiere und auf der Ordinate ist der Mittelwert der Anzahl der Sertoli-Zellen im Hodenkanälchenquerschnitt dargestellt. Zur Bestimmung dieses Mittelwertes wurden mind. 25 Kanälchen pro linker Hodenhälfte eines Tieres neanderförmig ausgewählt. Bei den behandelten Tieren zeigt sich teilweise eine schwankende Sertoli-Zell Ausprägung, mit dem kleinsten Wert 9,88 und dem größten Wert von 10,60. Für alle Werte wurde die Standardabweichung berechnet. Alle Werte sind signifikant ( $p < 0,05$ ).

Die Schnitte und die erhobenen Messdaten bei den unbehandelten Tieren zeigen, wie in der Literatur bei **Hess ( 1990 )** beschrieben, eine altersgerechte Entwicklung des morphologischen Aufbaus der Tubuli, eine altersadäquate Entwicklung der Spermatogenese sowie eine entsprechend regelgerechte Ausprägung der Zellstadien ( s. z.B. Abb 21 u. 31 ).

### 3.1.1.2 Befunde über den Vorgang der Spermatogenese ( Abb. 6 - 7 )

Eine genaue Stadieneinteilung der Spermatogenese ist auf Grund der strukturellen Veränderung durch die DEHP-Behandlung nicht möglich.

D.h. also:

- Spermatogonien sind teilweise erkennbar
- Spermatozyten I sind selten identifizierbar, meist gar nicht vorhanden.
- Spermatozyten II, Spermatiden, Spermatozoon sind nicht vorhanden.
  - Zellgrenzen und der Interzellularraum mit Fibroblasten wie peritubulären Zellen sind gut abgrenzbar und wirken intakt.
- Leydigzellen sind identifizierbar und scheinen durch die Behandlung mit DEHP keine morphologisch erfassbare Veränderung erfahren zu haben.

Weiter zum Lumen des Kanälchens hin sind keine Spermatogenese-Stufen mehr abgrenzbar bzw. erkennbar und in den meisten Tubuli sind optisch, sogar makroskopisch mittig große Vakuolen adluminal und darüber hinaus bis in die Lumenmitte Zelltrümmer zu erkennen.

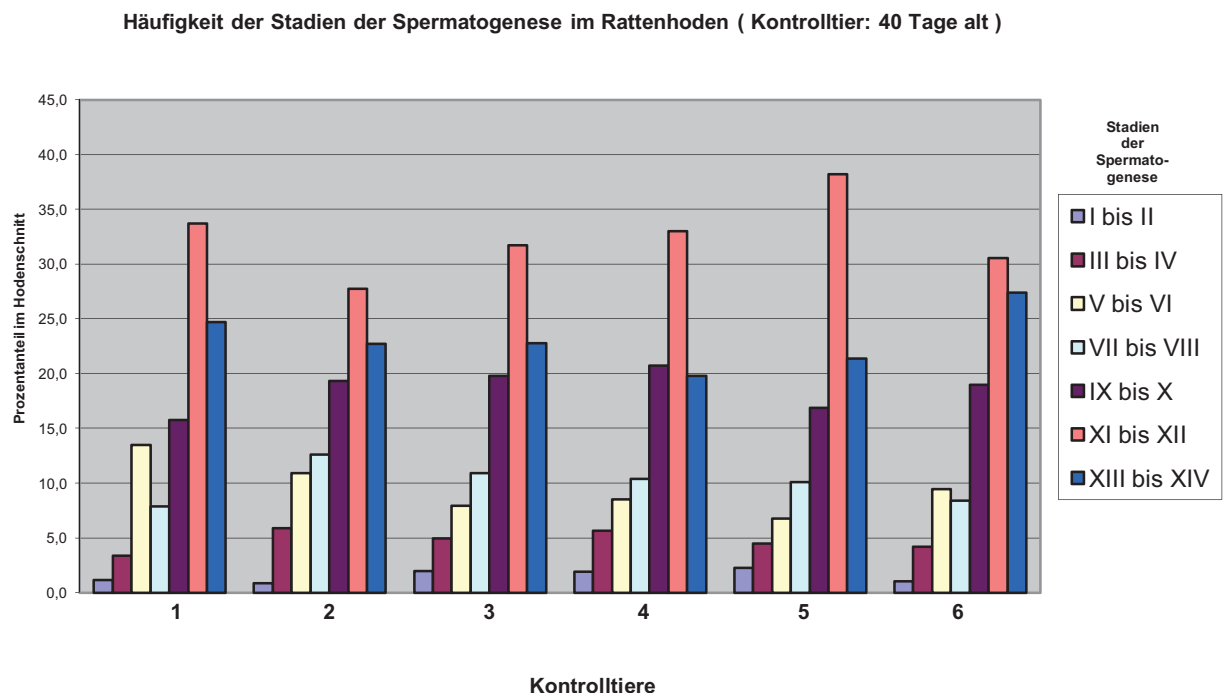


Abb. 6

Häufigkeit der Stadien der Spermatogenese im Rattenhoden ( Kontrolltier: 40 Tage alt )

Das Stadienpaar XI-XII ist am stärksten ausgeprägt, sein Anteil an den Gesamtanzahl der Stadienpaare beträgt im Durchschnitt 32,5%.



Am zweit häufigsten ist das Stadienpaar XIII-XIX mit 23,1% vertreten. Ebenfalls relativ oft vertreten ist mit 18,6% das Stadienpaar IX-X. Der Anteil der Stadienpaare V-VIII liegt zwischen 5-10%, die übrigen Paare sind gering ausgeprägt und machen einen Anteil von < 5% aus.

Die Daten der 50 Tage alten Kontrolltiere sind in der folgenden Abb. 7 erfasst:

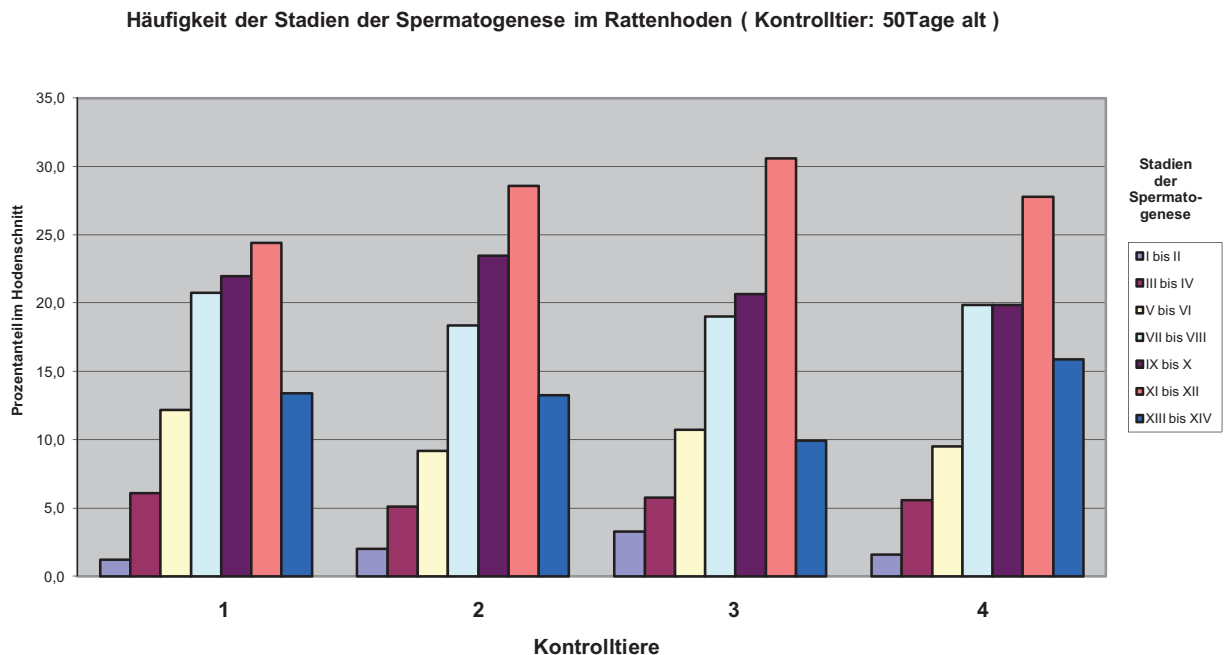


Abb. 7

Häufigkeit der Stadien der Spermatogenese im Rattenhoden ( Kontrolltier: 50 Tage alt )

Wie aus der Graphik ersichtlich, ist die Ausprägung der Stadienpaare alterstypisch entwickelt.

Auch hier, ist das Stadienpaar XI-XII trotz leichten Rückgangs mit 27,8% am stärksten ausgeprägt. Beim Paar XIII-XIV kommt es zu einem deutlichen Rückgang, es ist mit 13,1% vertreten.

Deutliche Steigerungen werden hingegen sichtbar bei den Stadienpaaren VII-VIII (19,5%) u. IX-X (21,5%). Ihr Anteil an der Gesamt-Stadienpaar-Anzahl verdoppelt sich somit von etwa 10% auf 20%.

Die übrigen Stadienpaar bleiben auf niedrigem Niveau gleich.

Die Bcl2-behandelten Schnitte sind nicht nur im Hinblick auf die immunhistochemische Reaktion untersucht worden, sondern an Hand dieser Schnitte wurde eine Einteilung in die Spermatogenesestadien nach Leblond und Clermont (1952) vorgenommen.

Diese Einteilung in 14 Stadien wurde in sofern modifiziert, dass aus den 14 Einzelnen, 7 Paare gebildet wurden. So ist jeder Tubulus seminiferus einem der 7 Paare zugeordnet worden.

Zusammenfassend zeigt sich ein Unterschied zwischen dem Alter der Versuchstiere in der Verteilung bezogen auf die Stadienpaare VII-VIII u. IX-X und der niedrigeren Ausprägung des Stadiums XIII-XIV der 50 Tage alten Tiere.

Die Anzahl der ausgebildeten Stadienpaare beim Vergleich der beiden Altersgruppen bleibt gleich.

### **3.1.2 Befunderhebung über die Cleaved-Caspase3-Immunreaktion ( Abb. 16 - 18; 36 – 38 u.40 )**

Die Auswertung dieser immunhistochemischen Antikörper-Färbung zeigt bei den unbehandelten Versuchstieren eine z.T. stark bis sehr stark positive Reaktion adluminal, in den mittleren Zellstadien und somit von den basalen Zellformationen abgrenzbar, d.h. speziell bei den Leydigzellen ist keine Reaktion erkennbar.

Bei den positiven Zelltypen handelt es sich um sekundäre Spermatozyten und runde sowie elongierte Spermatiden ( s. Abb. 36, 37, 338 ). Auffällig ist zudem die stark ausgeprägte Reaktion der Akrosomenkappen. Dies wird in der Gruppe der 40 Tage alten Tiere evident ( s. Abb. 26 ). Peritubulär scheinen hier keine Reaktionen stattzufinden, die immunhistochemische Aktivität beschränkt sich ausschließlich auf die Tubuli seminiferi ( s. Abb. 16 u. 40 ) .

Für die behandelten Tiere ergeben sich folgende Beobachtungen:

Eine Immunreaktion fehlte in den sekundären Spermatozyten. Die Reaktion der intratubulären Strukturen wirkt im Vergleich zu den unbehandelten Tieren stärker ausgeprägt. Die morphologische Darstellung der Tubuli seminiferi der 30 Tage alten Tiere ist gut sichtbar. Auf Grund der DEHP-Behandlung sind die Zellstrukturen, die bei den unbehandelten Tieren eine starke immunhistochemischen Reaktion hervorrufen, hier nicht mehr vorhanden. Demzufolge sind bei den behandelten Tieren auch keine Immunreaktion-Reaktionen nachweisbar ( Abb. 17, 18 ).

### **3.1.3 Befunderhebung über die Bcl2-Immunreaktion (Abb. 41 - 43)**

Hierbei konnten allerdings nur die unbehandelten Tiere berücksichtigt werden, da die durch die Behandlung mit DEHP entstandenen Veränderungen derart waren, dass keine Aussage mehr darüber getroffen werden konnte, in welchem Stadienpaar der

Spermatogenese sich ein bestimmter Tubulus befand, da die hierfür nötigen Zellkomponenten deformiert und teilweise nicht mehr vorhanden waren ( Abb. 20 ). Bei den behandelten Tieren sind lediglich die basalen Zellen erhalten und beurteilbar. Auch die 30 Tage alten unbehandelten Tiere konnten bei der Stadieneinteilung nicht berücksichtigt werden, da sich die für die Differenzierung nötigen Zellstrukturen altersentsprechend noch nicht ausgebildet hatten ( Abb.41 ).

Die immunhistochemische Reaktion zeigt eine mäßig starke Ausprägung bei elongierten Spermatisden und eine stärkere Ausprägung bei Akrosomenkappen bzw. – bläschen und bei den runden Spermatisden.

Die Untersuchung der Häufigkeit der Stadien der Spermatogenese bei den 40 Tage alten Kontrolltieren lässt sich anhand der Abb. 6 darstellen:

***Die Abbildungen sind im folgenden Abschnitt nach dieser Reihenfolge zusammengestellt:***

- I. 50 Tage alte Ratten (Behandlungsdauer: 30 Tage; **Abb. 11-20**)
  1. PJS
  2. Cleaved Caspase-3
  3. Bcl2
  
- II. 40 Tage alte Ratten (Behandlungsdauer: 20 Tage; **Abb. 21-30**)
  1. PJS
  2. Cleaved Caspase-3
  3. Bcl2
  
- III. 30 Tage alte Ratten (Behandlungsdauer: 10 Tage; **Abb. 31-43**)
  1. PJS
  2. Cleaved Caspase-3
  3. Bcl2

## Vergrößerungsmaßstab

I Maßstab: 100  $\mu\text{m}$  ( 1,8cm d. Abb. bei Objektiv 16). 1cm = 55 $\mu\text{m}$

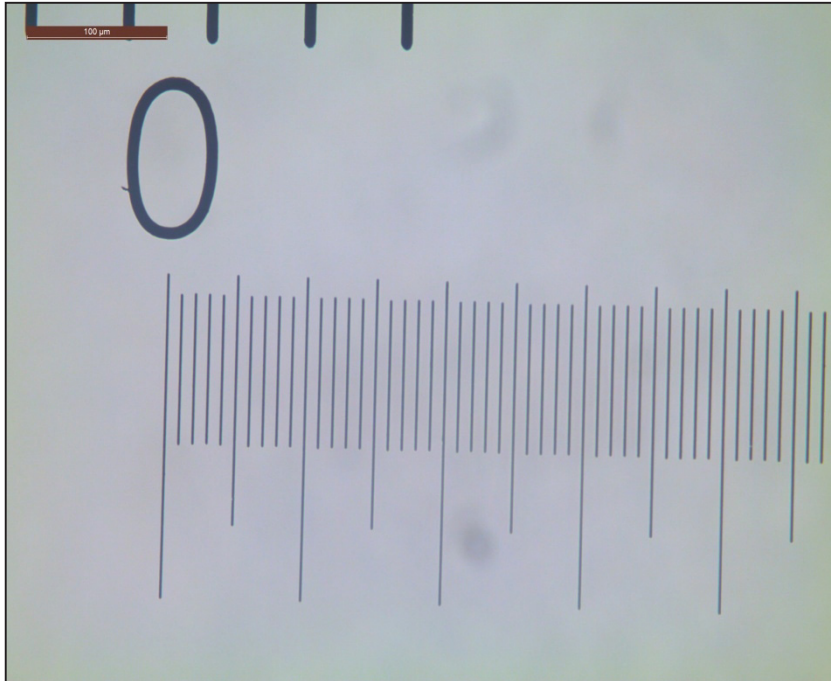


Abb. 8

II Maßstab: 100  $\mu\text{m}$  ( 3,7cm d. Abb. bei Objektiv 40). 1cm = 27 $\mu\text{m}$

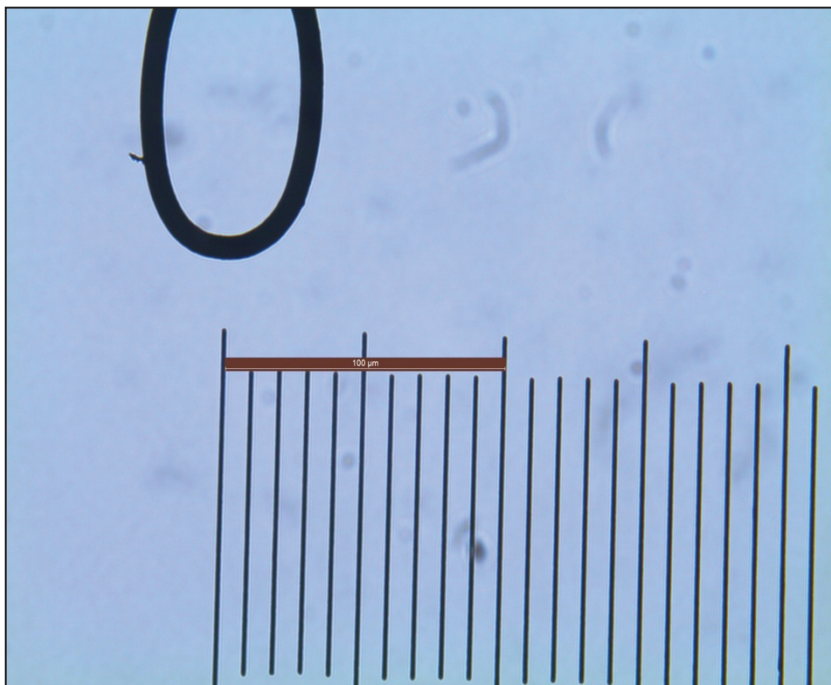


Abb. 9

III Maßstab: 100 µm ( 5,8cm d. Abb. bei Objektiv 100). 1cm = 17µm

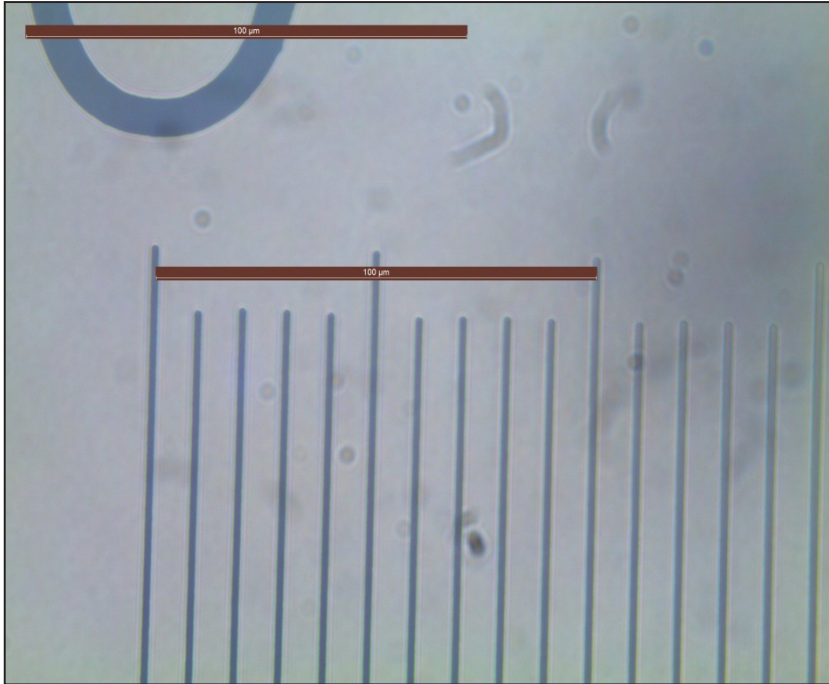


Abb. 10

### 3.1.4 Fotos der mit DEHP-behandelten Tiere und deren Kontrolltieren:

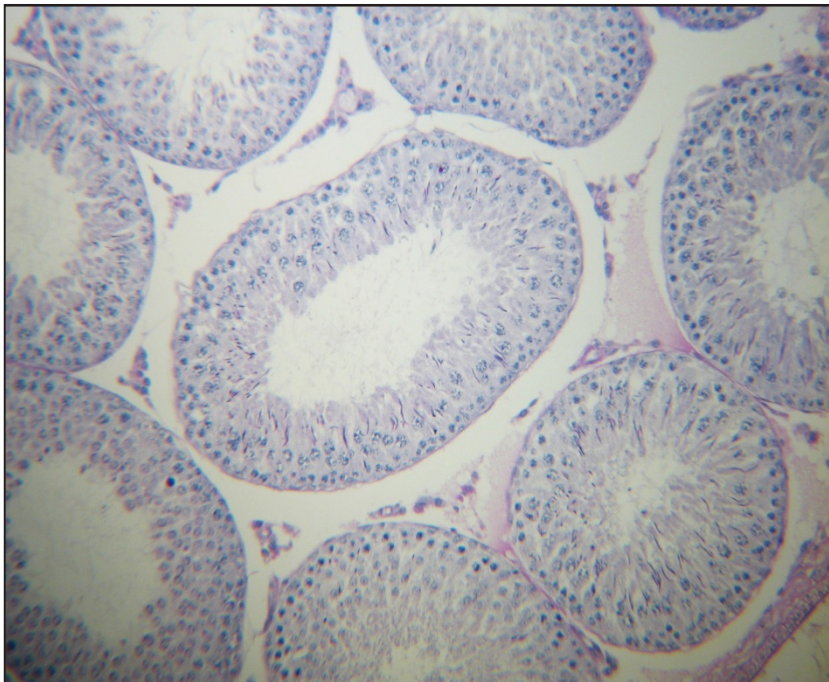
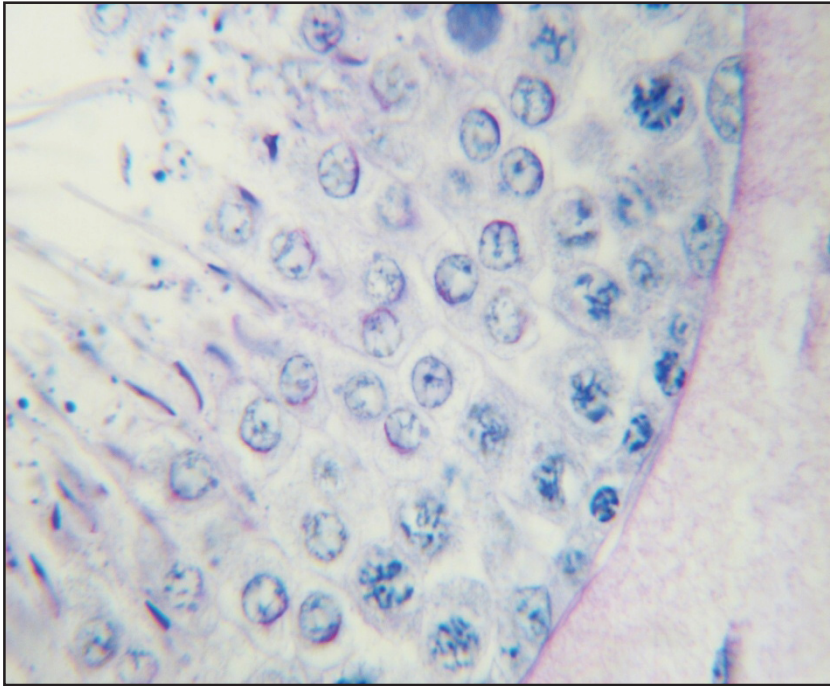


Abb. 11

Paraffin-Schnitt. PJS-Färbung+Hämalaun. *Kontrolltier 50 Tage alt.*

Endgültige Vergrößerung: x 180.1cm d. Abb.= 55µm

Zu sehen sind mehrere Tubuli seminiferi mit Ausprägung einer typischen Spermatogenese. Rechts unten im Bild erkennt man die Tunica albuginea.

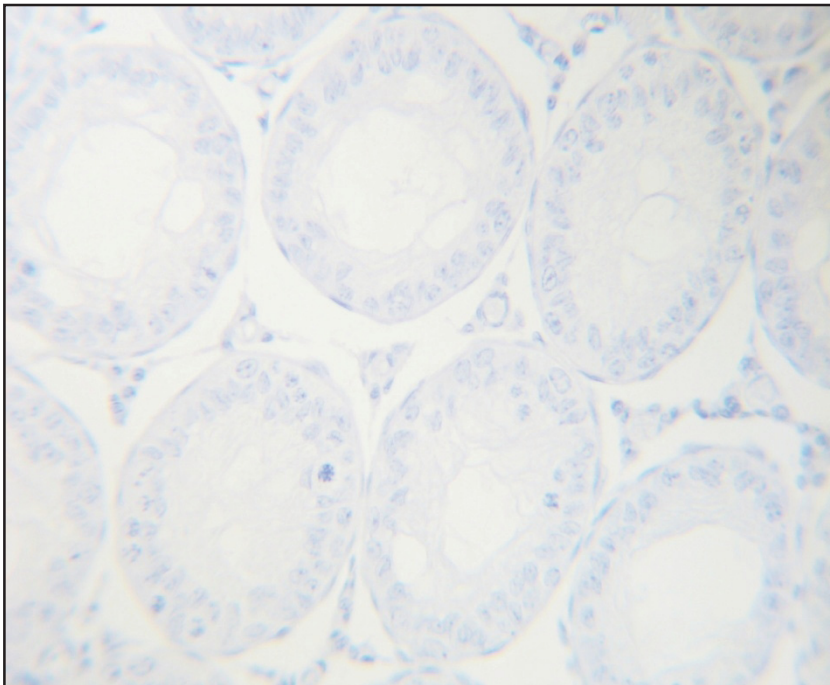


**Abb. 12**

Paraffin-Schnitt. PJS-Färbung+Hämalaun. *Kontrolltier 50 Tage alt.*

Endgültige Vergrößerung: x 1100.1cm d. Abb.= 17 $\mu$ m

.In dieser Vergrößerung eines Tubulus kann man das fortschreiten der Spermatogenese Stadien beobachten. Hier sieht man z.B. Stadium VII mit Stufe 19 und 20.

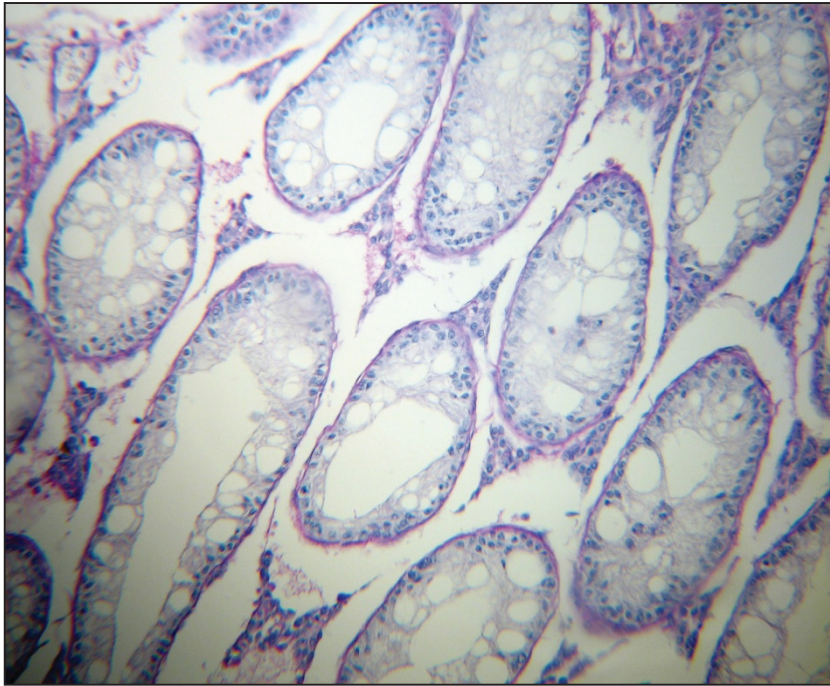


**Abb. 13**

Paraffin-Schnitt. *Kontroll-Schnitt 50 Tage altes Tier.*

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27 $\mu$ m

*Negativ Kontrolle* der immunhistochemischen Caspase Reaktion.

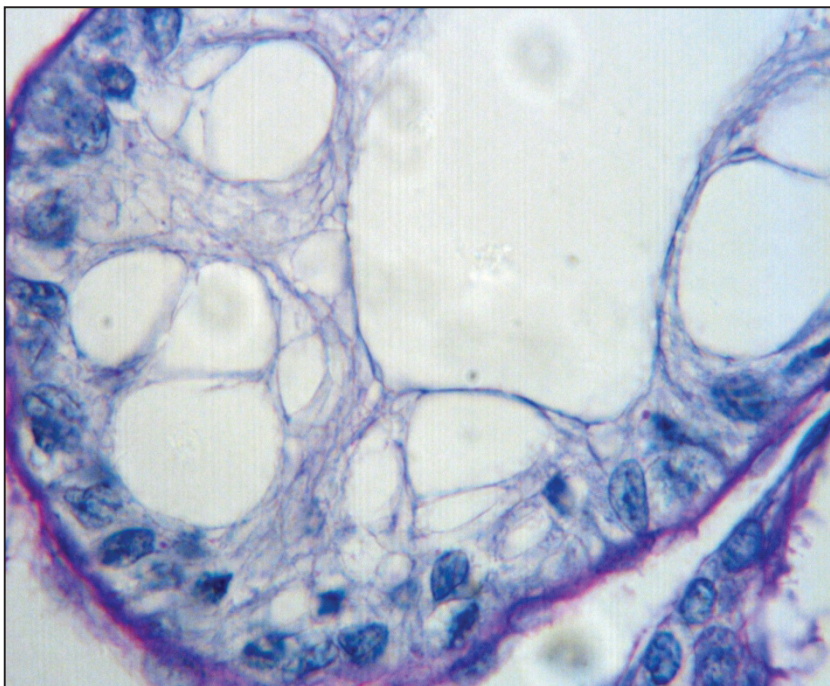


**Abb. 14**

Paraffin-Schnitt. PJS-Färbung+Hämalaun. DEHP-behandeltes Tier 50 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 180.1cm d. Abb.= 55 $\mu$ m

Es sind mehrere Tubuli mit starken Deformierungen der einzelnen Spermatogenesestadien bzw. großen intratubulären Vakuolen dargestellt.

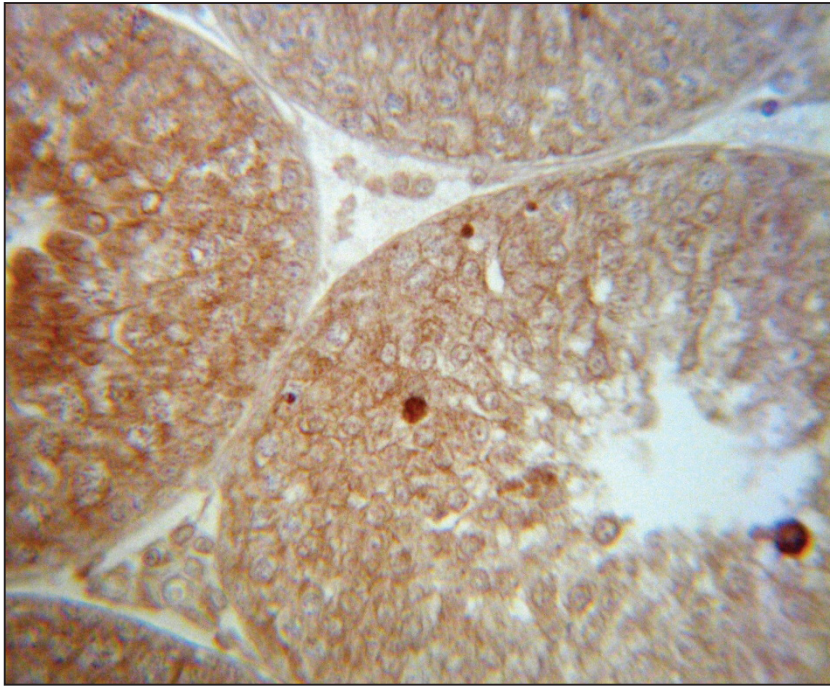


**Abb. 15**

Paraffin-Schnitt. PJS-Färbung+Hämalaun. DEHP-behandeltes Tier 50 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 1100.1cm d. Abb.= 17 $\mu$ m

Die basalen Zellen wie Spermatogonien und Sertoli-Zellen sind z.T. sichtbar. Weitere Spermatogenesestadien fehlen jedoch. Mehrere Vakuolen im Tubulus seminiferus sind durch eine dünne Membran abgegrenzt.

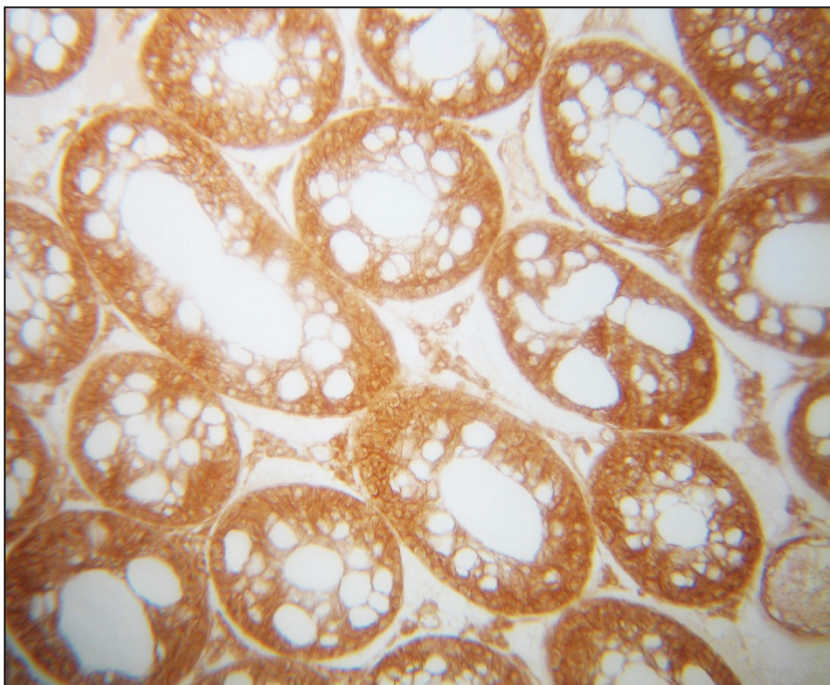


**Abb. 16**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Caspase Reaktion. Kontrolltier 50 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27µm

Hier sind Ausschnitte aus mehreren Tubuli abgebildet. Z.T. stark positive Immunreaktionen sind im Zytoplasma und im Kern der einzelnen Zellen der Spermatogenese erkennbar.



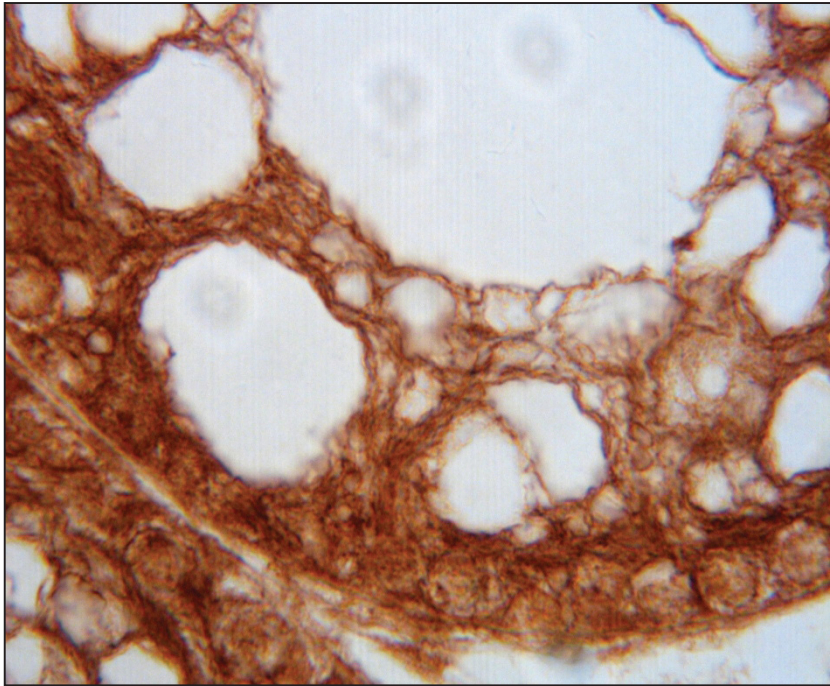
**Abb. 17**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Caspase Reaktion DEHP-behandeltes Tier 50 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27µm

Zu sehen sind verschiedene Tubuli seminiferi mit Vakuolen, ein Spermatogenese-Stop ist zu beobachten.



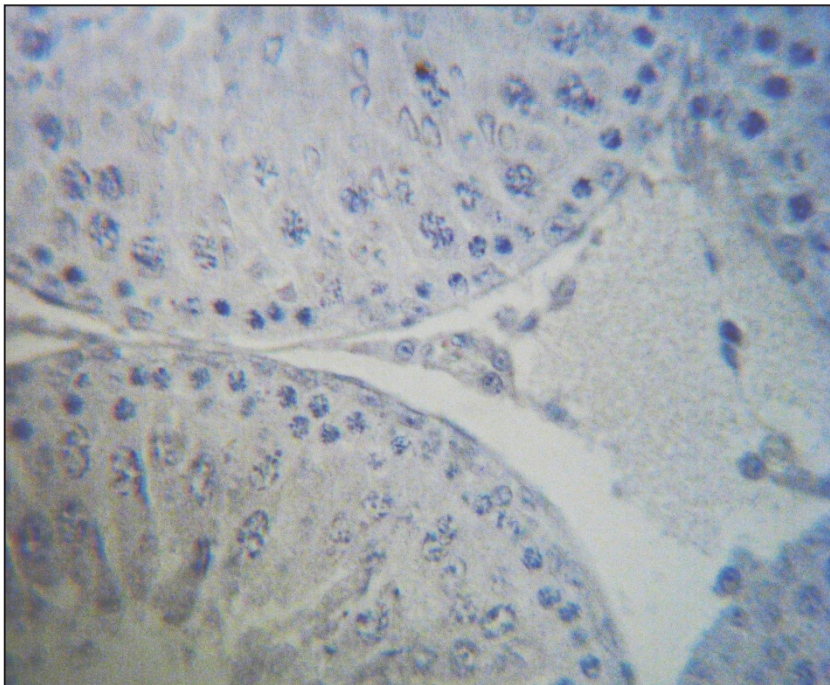


**Abb. 18**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Caspase Reaktion. DEHP-behandeltes Tier 50 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 1100.1cm d. Abb.= 17µm

.Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 30. Durch die Deformierung ist eine Einteilung in Spermatogenesestadien nicht möglich. Man kann einige Sertoli-Zellen identifizieren. Bei diesen zeigt das Zytoplasma eine positive Immunreaktion.

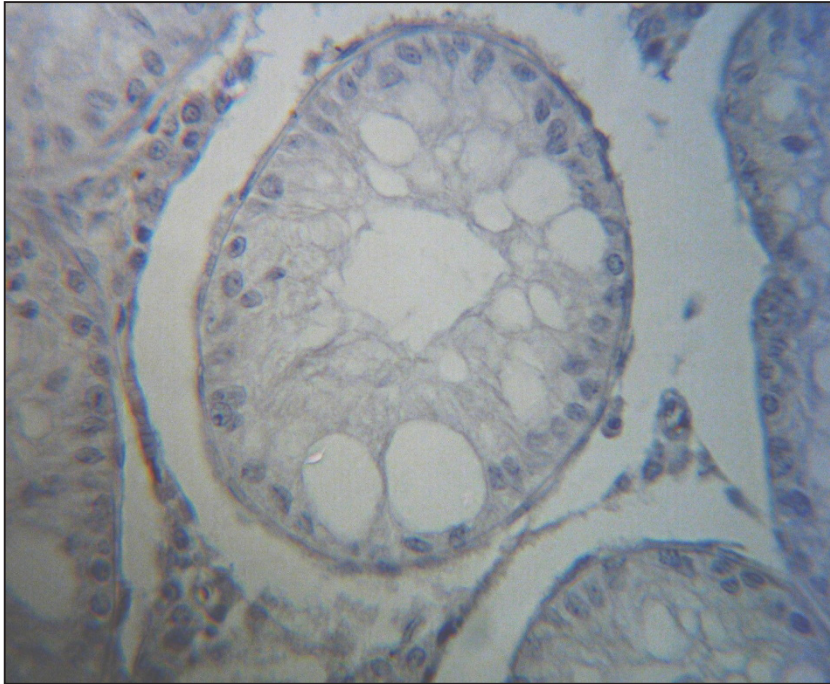


**Abb. 19**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Bcl2 Reaktion. Kontrolltier 50 Tage alt. Endgültige

Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27µm.

In diesem Ausschnitt sind peritubulärer Raum und mehrere Tubuli seminiferi, in denen eine unauffällige Spermatogenese zu beobachten ist, dargestellt.

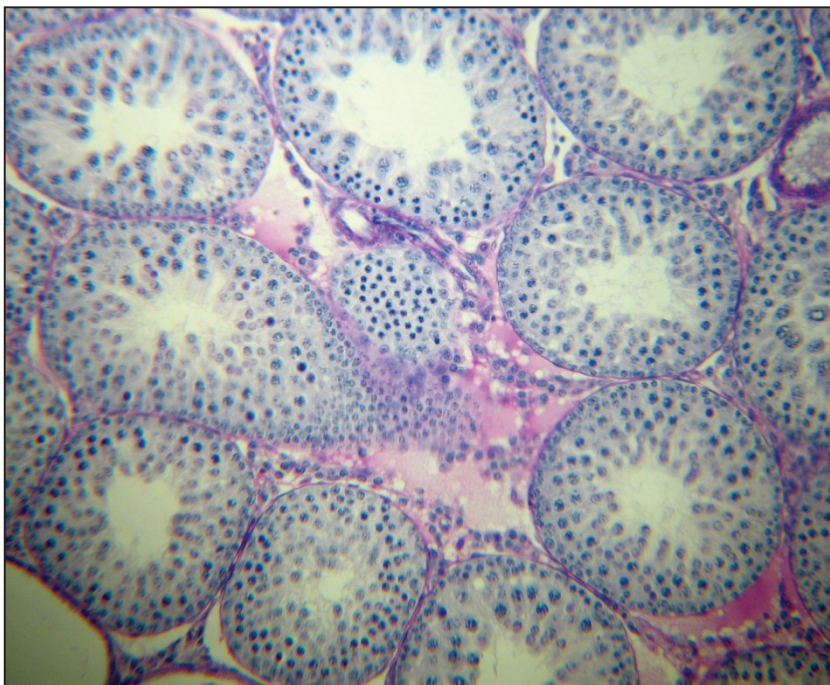


**Abb. 20**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Bcl2 Reaktion. DEHP-behandeltes Tier 50 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27µm

Zusehen ist ein zentral gelegener Tubulus seminiferus, bei dem deutliche Veränderungen der Spermatogenesestadien zu erkennen sind.

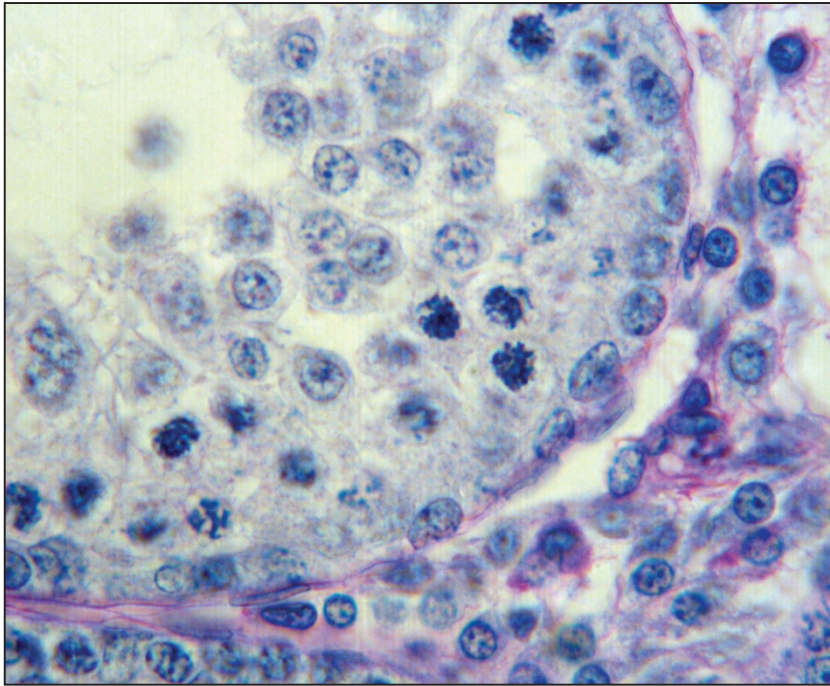


**Abb. 21**

Paraffin-Schnitt. PJS-Färbung+Hämalaun. Kontrolltier 40 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 180.1cm d. Abb.= 55µm

Hier sieht man eine Übersicht über die Spermatogenese in mehreren Tubuli Seminiferi.

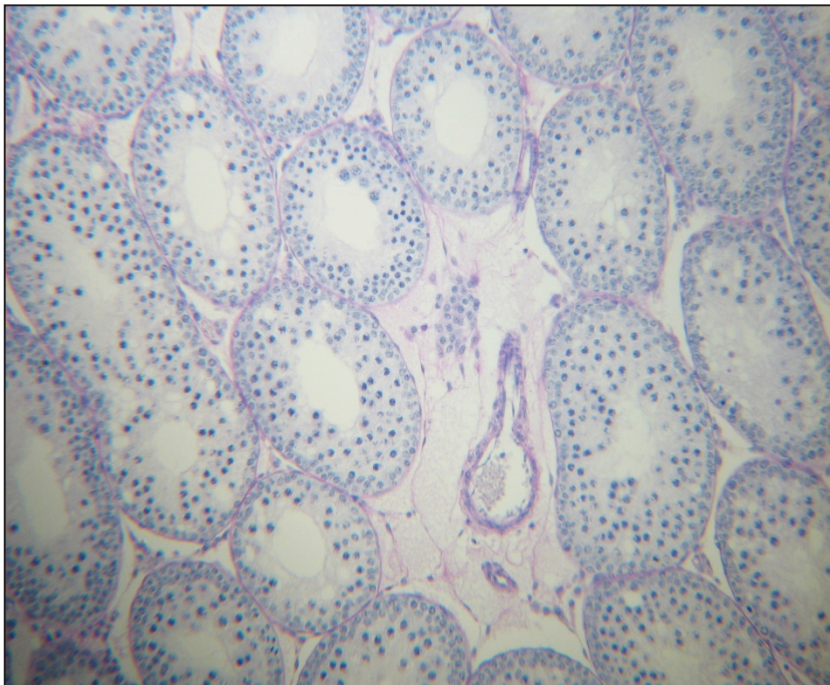


**Abb. 22**

Paraffin-Schnitt. PJS-Färbung+Hämalaun. Kontrolltier 40 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 1100.1cm d. Abb.= 17 $\mu$ m

Die Spermatogenese ist bis zum Stadium der runden Spermatiden fortgeschritten.

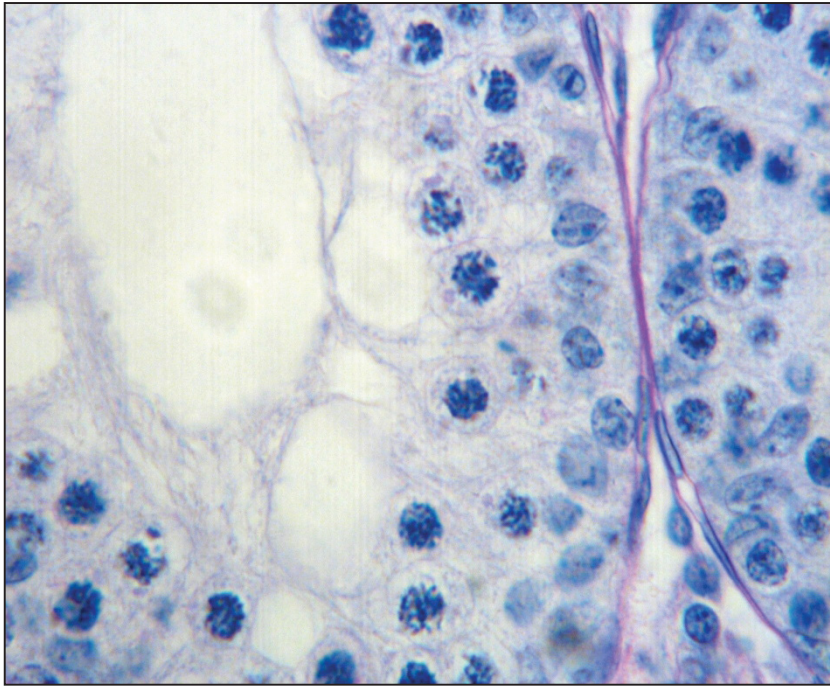


**Abb. 23**

Paraffin-Schnitt. PJS-Färbung+Hämalaun. DEHP-behandeltes Tier 40 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 180.1cm d. Abb.= 55 $\mu$ m

Ausschnitt mehrerer Tubuli seminiferi mit einem zentral gelegenen Gefäß.

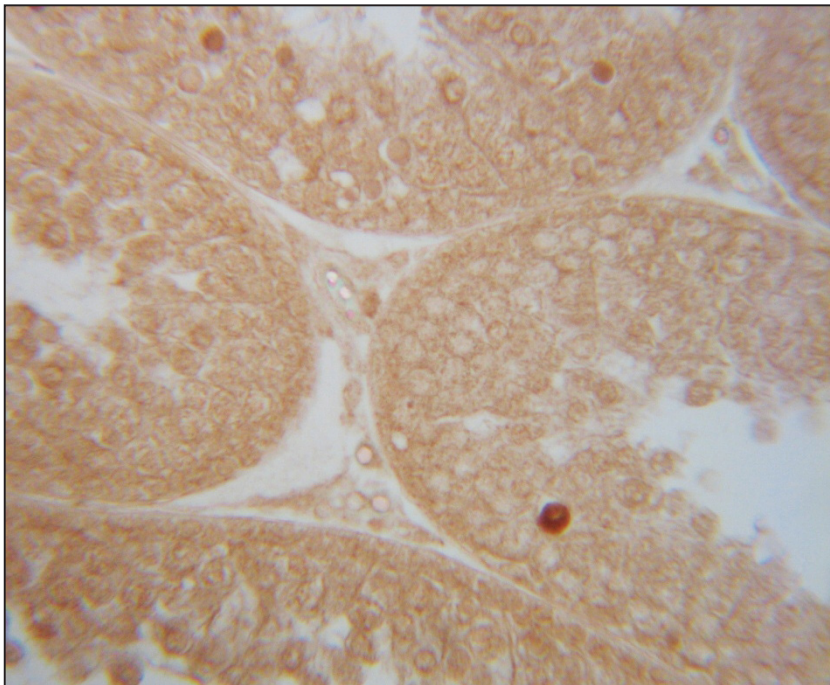


**Abb. 24**

Paraffin-Schnitt. PJS-Färbung+Hämalaun. DEHP-behandeltes Tier 40 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 1100.1cm d. Abb.= 17µm

Es sind nur Spermatogonien und Spermatozyten vorhanden. Die runden Spermatiden fehlen.

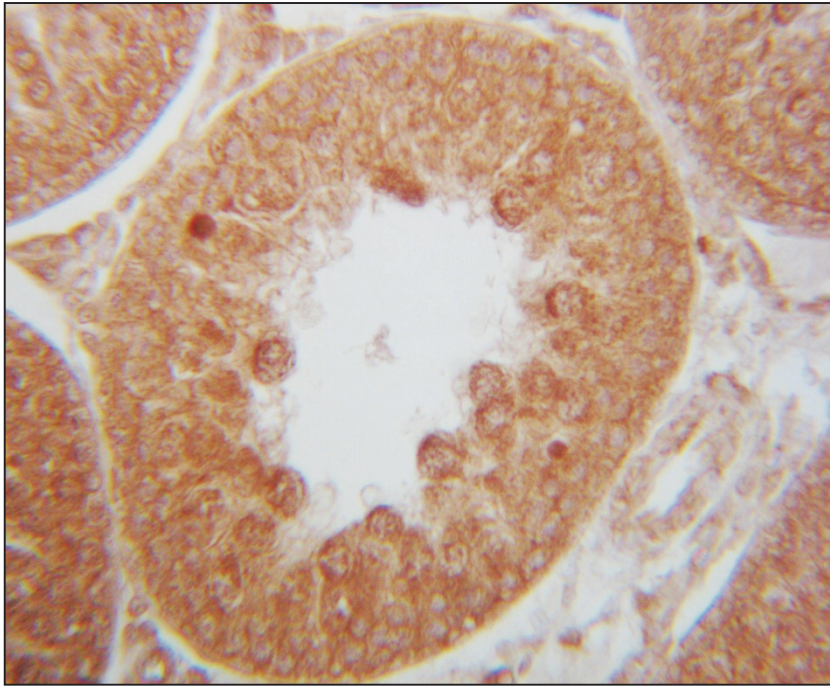


**Abb. 25**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Caspase Reaktion. Kontrolltier 40 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27µm

Hier sieht man einen Anschnitt mehrerer Tubuli in denen einige Spermatozyten eine deutliche Immunreaktionen aufweisen.

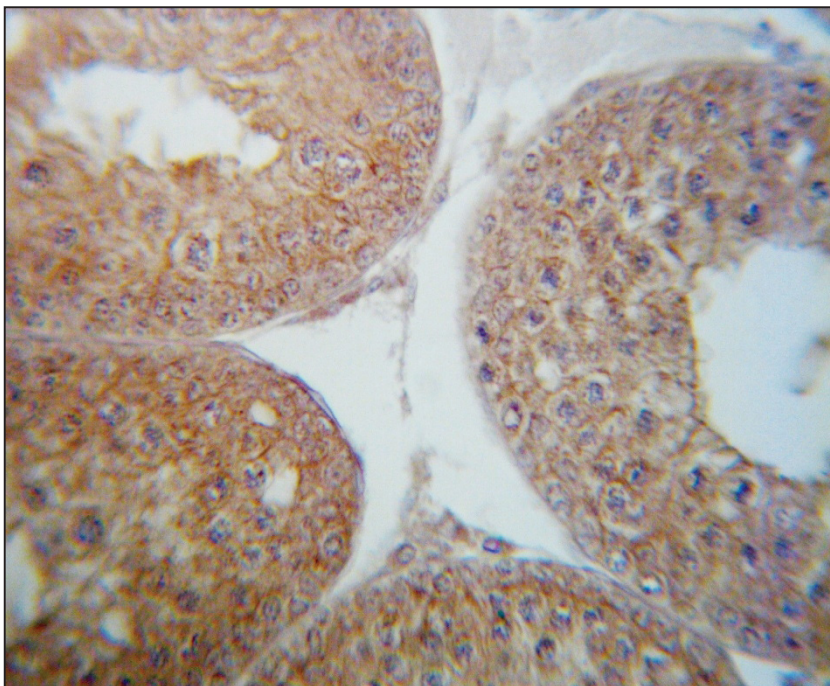


**Abb. 26**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Caspase Reaktion. Kontrolltier 40 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27µm

Zentral sieht man einen Tubulus mit einer adluminal sichtbaren Immunreaktion.

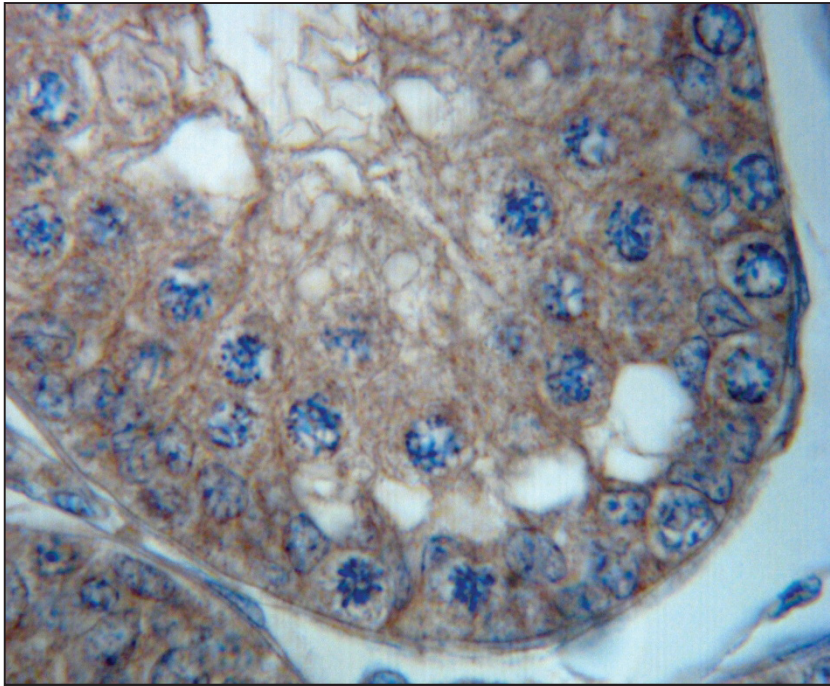


**Abb. 27**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Caspase Reaktion . DEHP-behandeltes Tier 40 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27µm

Es sind Ausschnitte mehrerer Tubul sichtbar in den Immunreaktionen stattfinden. Hauptsächlich sind die Reaktionen perinukleär in den Spermatozyten sichtbar.



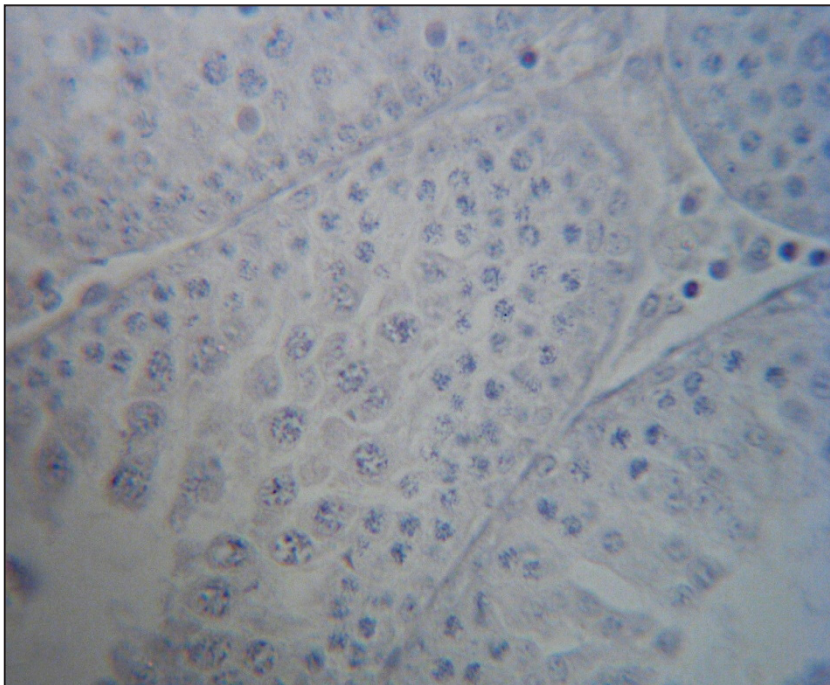
**Abb. 28**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Caspase Reaktion. DEHP-behandeltes Tier 40 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 1100.1cm d. Abb.= 17µm

Eine Immunreaktion ist diffus in allen Kanälchen vorhanden.

Bei der Abbildung handelt es sich um eine Ausschnittsvergrößerung. In ihr sind Störungen der Spermatogenesestadien erkennbar.

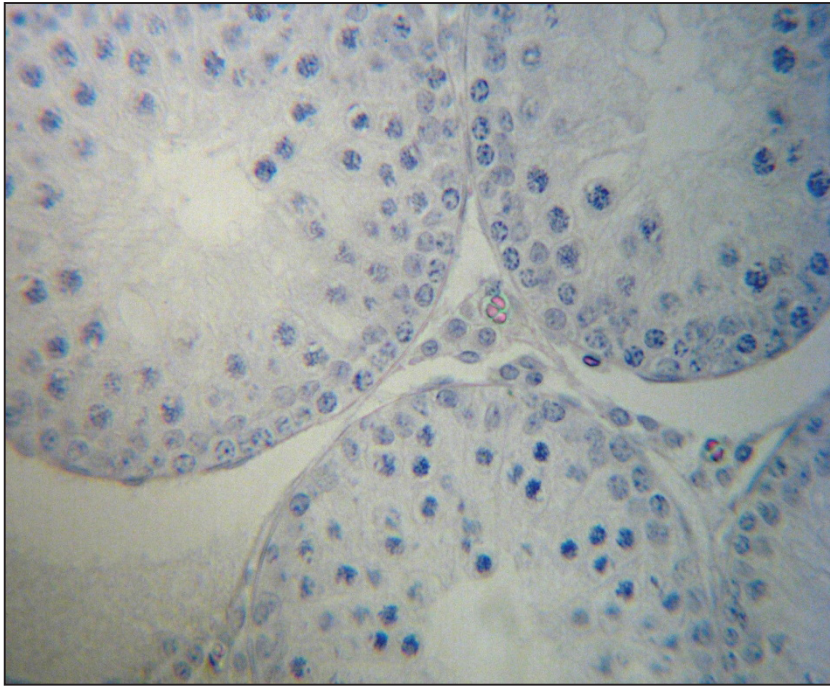


**Abb. 29**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Bcl2 Reaktion. Kontrolltier 40 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27µm

Auf diesem Ausschnitt kann man mehrere Tubuli seminiferi und peritubulären Raum, aber keine Immunreaktionen erkennen.

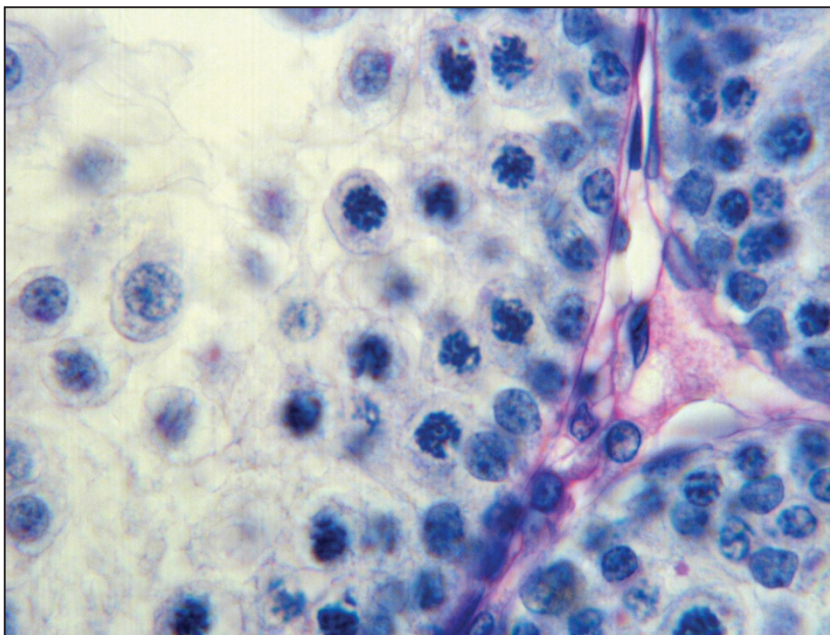


**Abb. 30**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Bcl2 Reaktion. DEHP-behandeltes Tier 40 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27µm

Es fehlt hier ebenfalls die Immunreaktion.



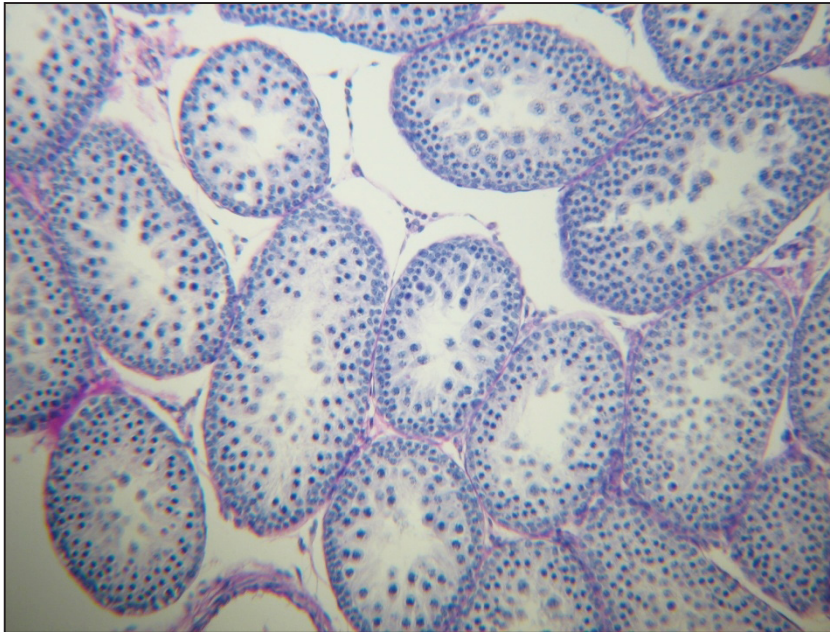
**Abb. 31**

Paraffin-Schnitt. PJS-Färbung+Hämalaun. Kontrolltier 30 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 1100.1cm d. Abb.= 17µm

In den Tubuli seminiferi ist die fortschreitende Spermatogenese bis zur Spermatozyte zu sehen.

Im Interstitium sind einige Leydig-Zellen zu beobachten.

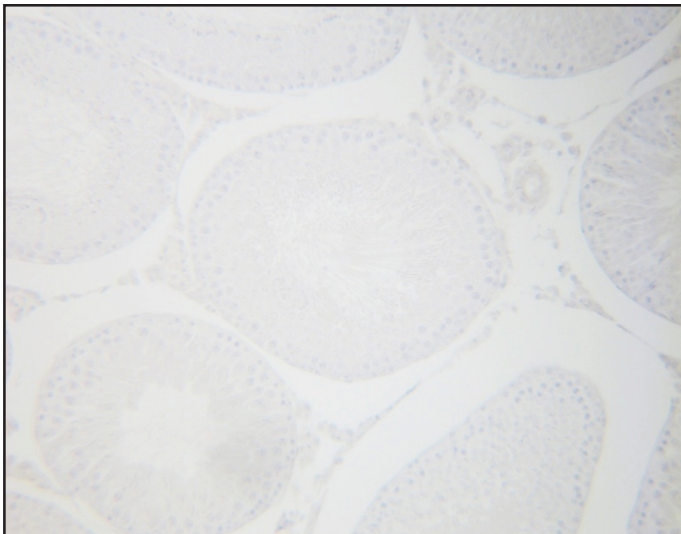


**Abb. 32**

Paraffin-Schnitt . PJS-Färbung+Hämalaun. Kontrolltier 30 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 180.1cm d. Abb.= 55µm

Hier sind Querschnitte verschiedener Tubuli seminiferi zu beobachten.



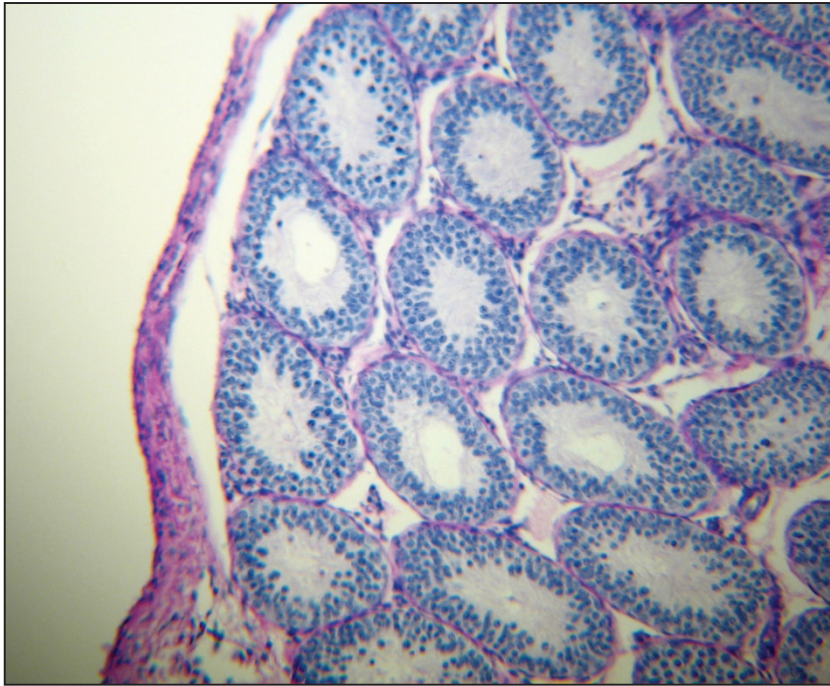
**Abb. 33**

Paraffin-Schnitt. Kontroll-Schnitt 30 Tage altes Tier.

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27µm

*Negativ Kontrolle* der immunhistochemischen Caspase Reaktion.



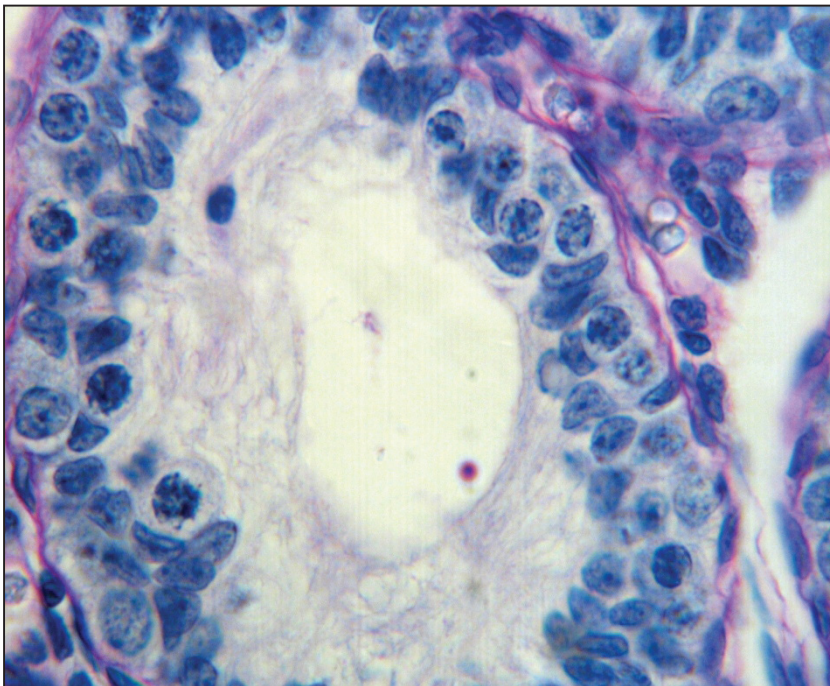


**Abb. 34**

Paraffin-Schnitt. PJS-Färbung+Hämalaun. DEHP-behandeltes Tier 30 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 180.1cm d. Abb.= 55µm

Hierbei handelt es sich um eine Übersicht der Spermatogenese, Auffällig ist die große Lichtung in den Tubuli seminiferi.



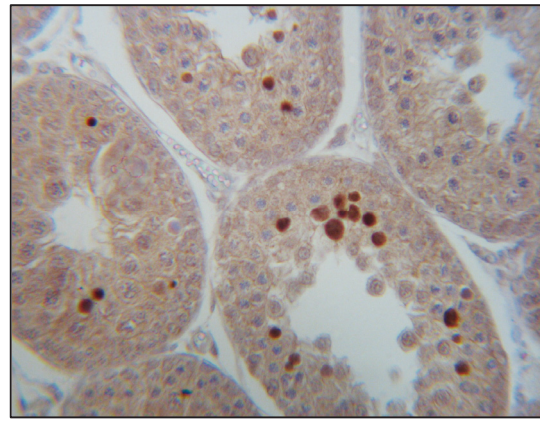
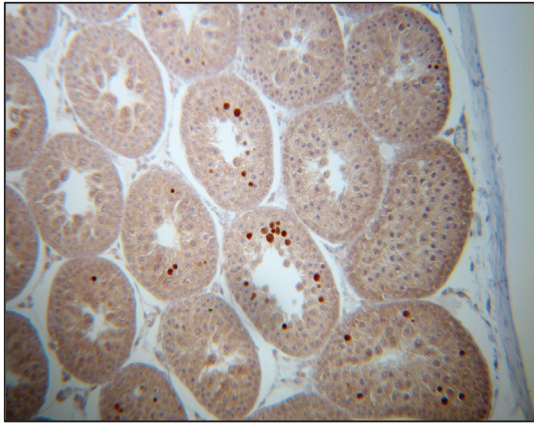
**Abb. 35**

Paraffin-Schnitt. PJS-Färbung+Hämalaun. DEHP-behandeltes Tier 30 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 1100.1cm d. Abb.= 17µm

Bei dieser Abbildung handelt es sich um eine Darstellung eines Tubulus seminiferus.

Basal sind Sertoli - Zellen und Spermatogonien erkennbar. Zum Lumen hin fehlen die weiteren Stufen der Spermatogenese (Spermatozyten und Spermatischen).



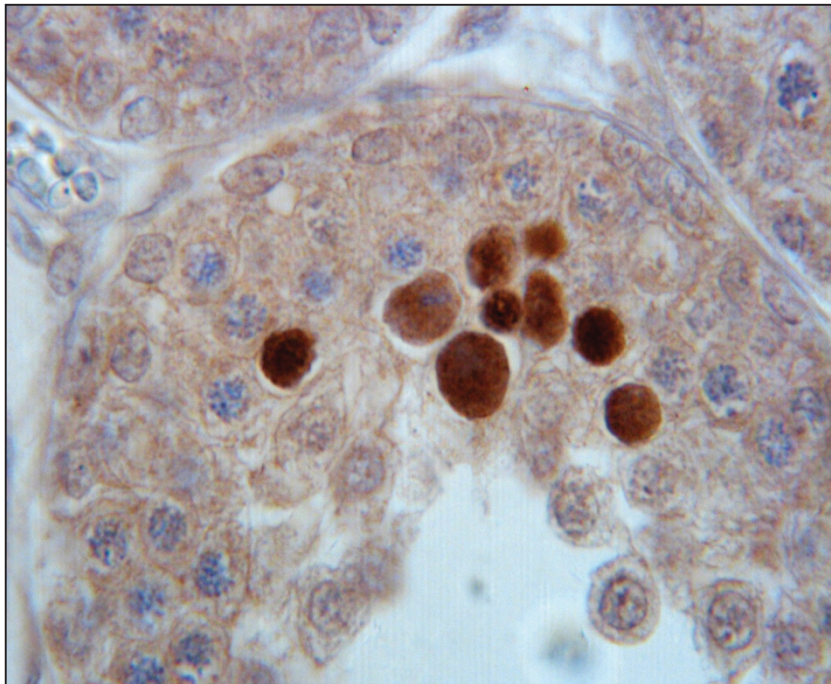
**Abb. 36 li. und Abb. 37 re.**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Caspase Reaktion. Kontrolltier 30 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 180.1cm d. Abb.= 55µm bzw.

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27µm.

Abbildung 37 ist eine Ausschnittsvergrößerung von Abbildung 36.

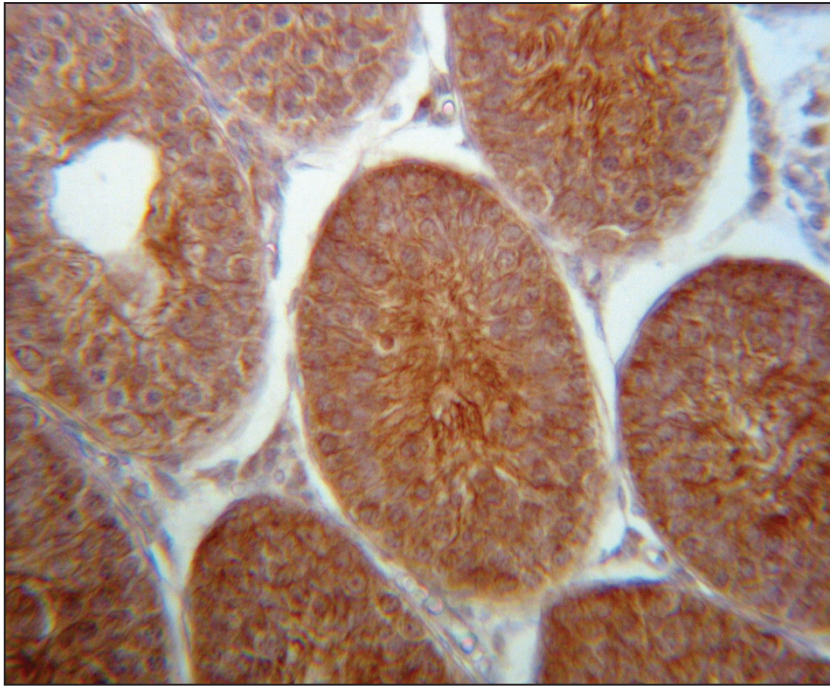


**Abb. 38**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Caspase Reaktion. Kontrolltier 30 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 1100.1cm d. Abb.= 17µm

Dies ist eine Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 37. Die Immunreaktion ist sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern der Spermatozyten vorhanden.

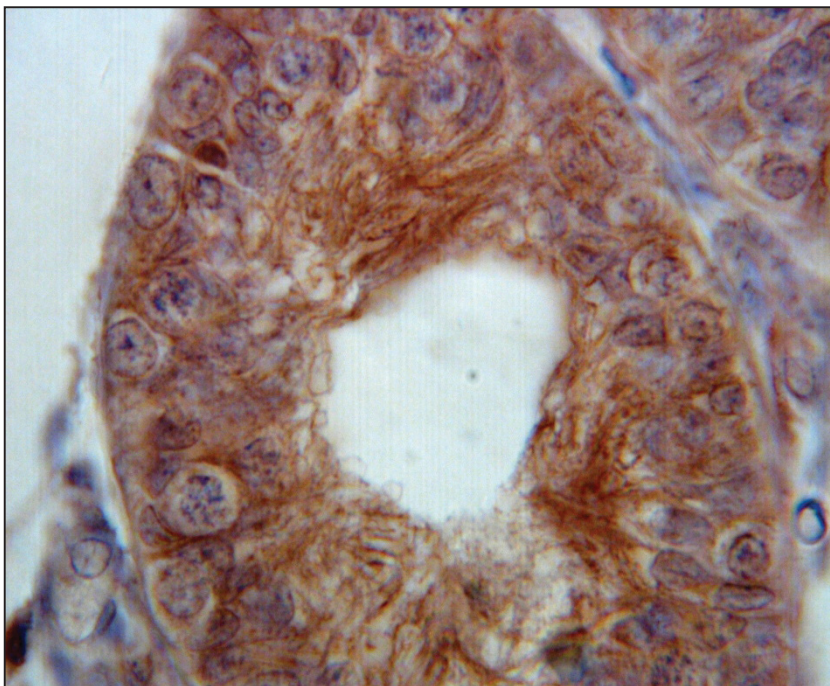


**Abb. 39**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Caspase Reaktion. DEHP-behandeltes Tier 30 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27µm

In den Spermatogonien und Spermatozyten ist eine perinukleäre schwache saumartige Immunreaktion erkennbar.



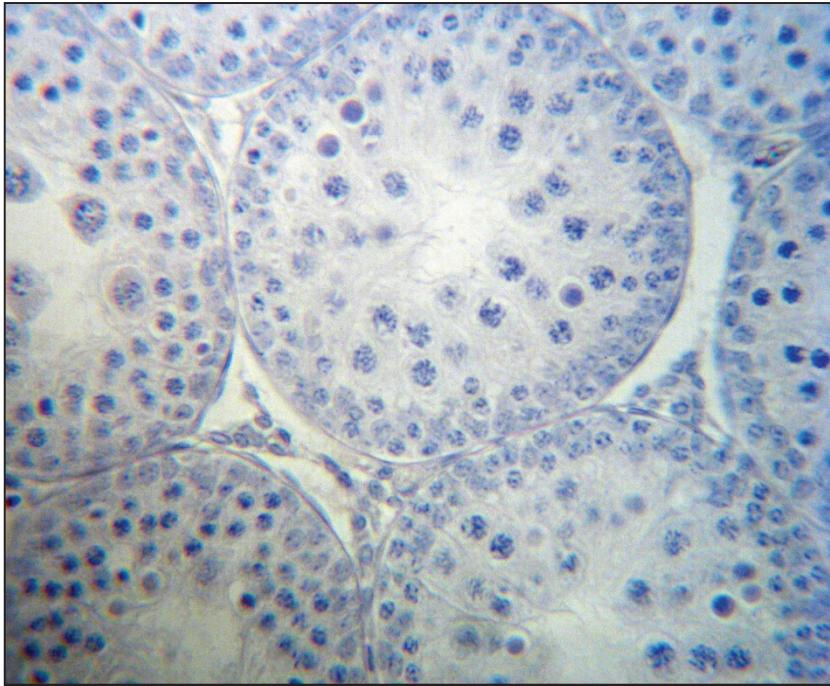
**Abb. 40**

Paraffin-Schnitt. Caspase-Anti-Körper-Färbung. DEHP-behandeltes Tier 30 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 1100.1cm d. Abb.= 17µm

Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 39.

Es sind perinukleär Immunreaktionen in der Spermatogonie und Spermatozyte sichtbar.

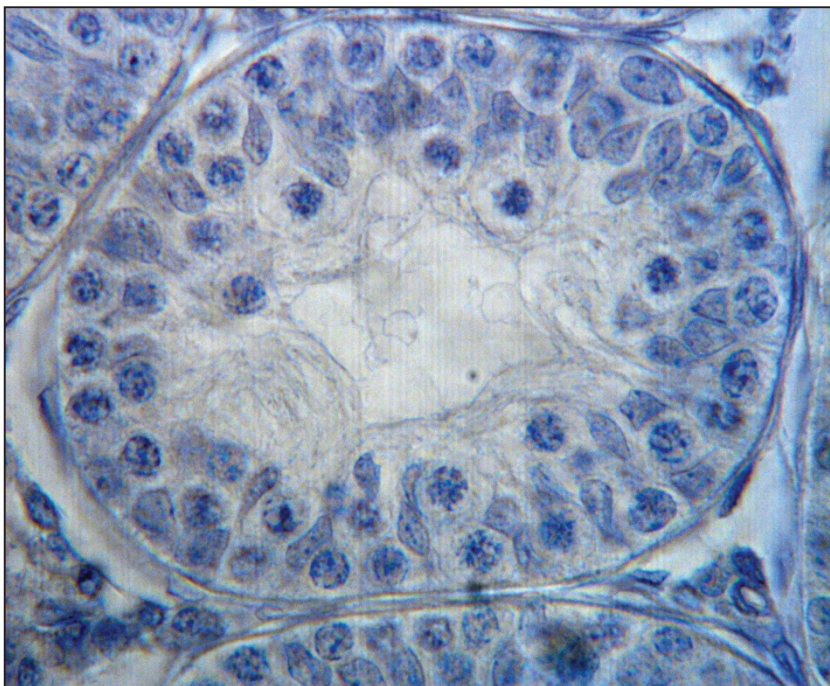


**Abb. 41**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Bcl2 Reaktion. Kontrolltier 30 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27 $\mu$ m

Sicht auf mehrere Tubuli seminiferi. Es ist keine immunhistochemische Reaktion erkennbar.

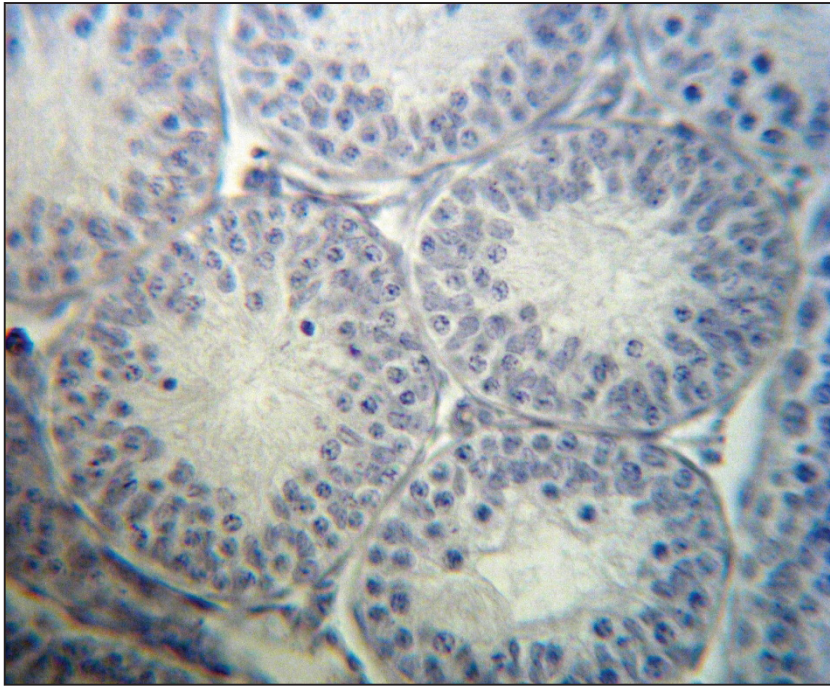


**Abb. 42**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Bcl2 Reaktion. DEHP-bahandeltes Tier 30 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 1100.1cm d. Abb.= 17 $\mu$ m

Im Tubulus seminiferus ist keine immunhistochemische Reaktion erkennbar. Basal sind Spermatogonien und Sertoli- Zellen zu sehen.



**Abb. 43**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Bcl2 Reaktion. DEHP-bahandeltes Tier 30 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27µm

Sicht auf mehrere Tubuli seminiferi. Es ist keine immunhistochemische Reaktion erkennbar.

## 3.2 Methimazol-Versuch

### 3.2.1 Befunde über die mit PJS + Hämalan gefärbten Schnitte (Abb. 44 – 49 )

Wie zuvor bei den DEHP-behandelten Tieren fällt auch bei diesen Schnitten ein Unterschied im Durchschnittswert der Durchmesser auf:

Alter Tiere in Tagen	120
Kontrolltiere	8,78
Methimazol behandelte Tiere	5,84

Tab. 2 Querdurchmesser des Hodenschnittes (mm)

Zeigt den Durchschnittswert der Durchmesser der Hoden im Vergleich Kontrolltiere vs. Behandelte (n = 8 Tiere)

Anhand der Abb. 46-47 wird sichtbar, dass die unbehandelte Tiergruppe einen unauffälligen morphologischen Aufbau, eine altersgemäße Entwicklung und Ausprägung der Zellstadien sowie eine alterstypische Spermatogenese aufweist. Bei den Methimazol behandelten Tieren zeigt sich basal und basalnah eine unauffällige Ausprägung der Zellstrukturen. Wie bei den mit DEHP-behandelten Tieren kommt es hier ebenfalls adluminal und im Lumen zu Veränderungen in der Ausprägung der unterschiedlichen Spermatogenesestadien. Die Graphiken (Abb. 44 und 45) vergleichen den Mittelwert der Sertoli-Zell-Ausprägung beider Versuchstierpopulationen:

Methimazol - Versuch Mittelwert der einzelnen Gruppen

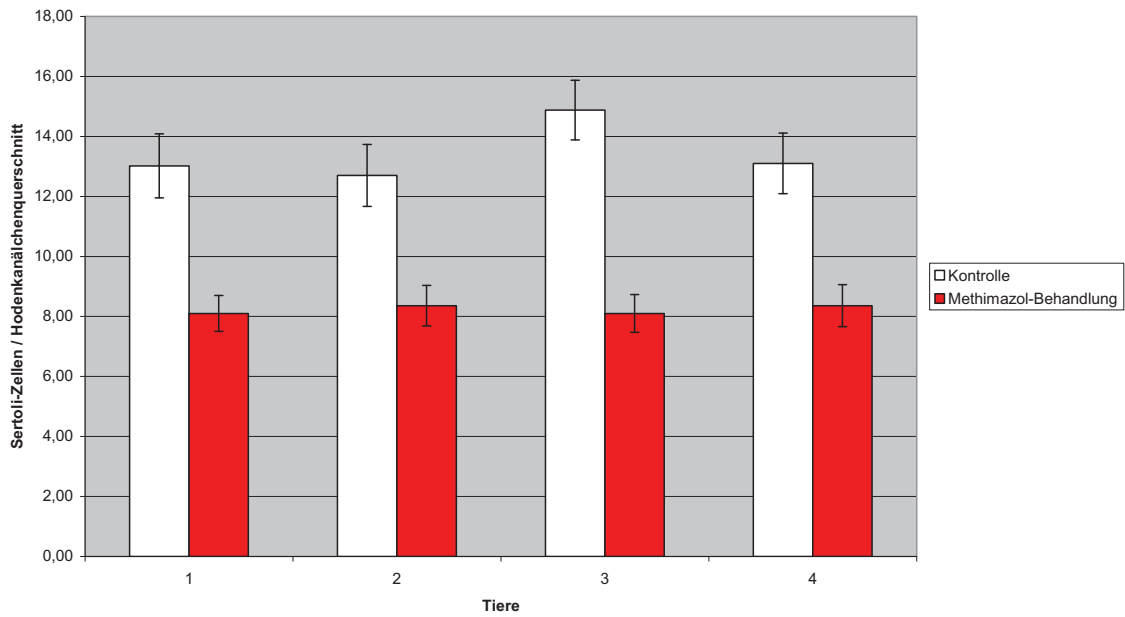


Abb. 44

Diese Graphik zeigt, dass die Tiere der Kontrollgruppe (4) deutlich mehr Sertoli-Zellen aufweisen als die behandelten Tiere (4). Es wurden 2-3 Schnitte pro Hoden kontrolliert mit je 25 Kanälchen pro Schnitt. Durchschnitt $\pm$ -Standardabweichung. Alle Werte sind signifikant ( $p < 0,05$ ).

Vergleich der Mittelwerte Kontrolltiere vs. Methimazol-Behandlung im Durchschnitt

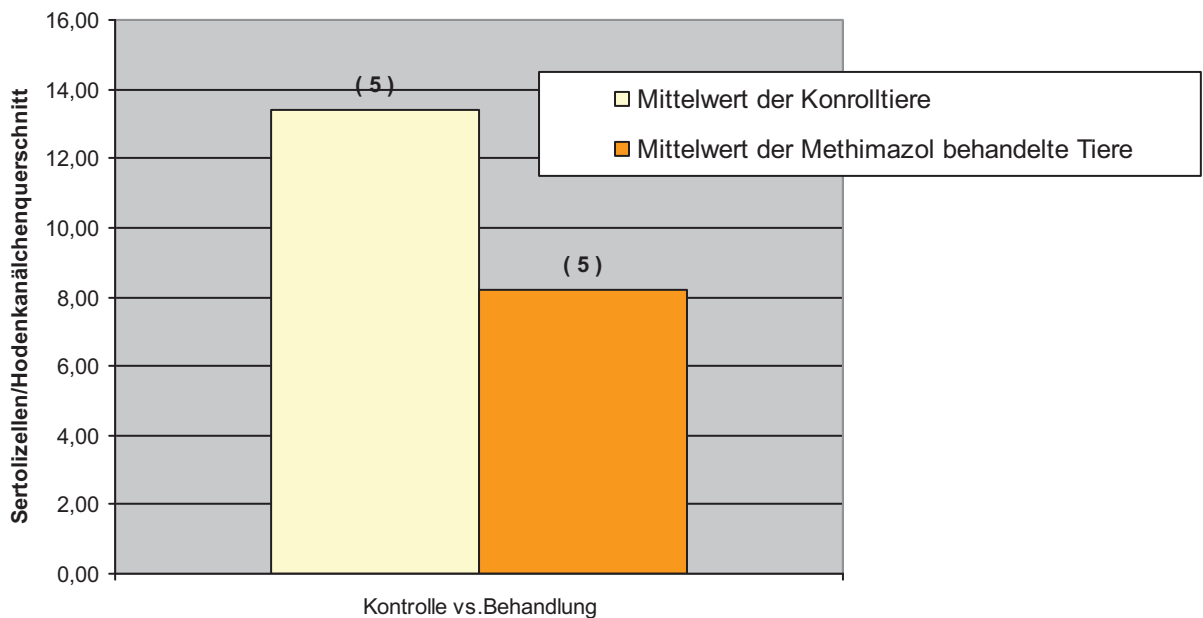


Abb. 45

Diese Graphik zeigt den Vergleich der Mittelwerte Kontrolltiere vs. Methimazol-Behandlung. Dabei weisen die Kontrolltiere deutlich mehr Sertoli-Zellen auf. Bei den Kontrolltieren beträgt der Durchschnittswert 13,43. Der Durchschnittsmittelwert bei den behandelten Tieren liegt bei 8,23.

Es wird ersichtlich, dass die Tiere der Kontrollgruppe deutlich mehr Sertoli-Zellen aufweisen als die behandelten Tiere.

Bei der Kontrollgruppe ist der kleinste Wert 8,1, der größte 8,36; ihr Mittelwert beträgt 8,23.

Die Gruppe der behandelten Tiere hat ihren kleinsten Wert mit 12,70 den größten bei 14,88, ihr Mittelwert beträgt 13,43.

### **3.2.2 Befunderhebung über die Cleaved-Caspase3-Immunreaktion (Abb. 50 – 52 )**

In der Gruppe der unbehandelten Tiere ist eine gute Anfärbarkeit und Darstellung der Zellstrukturen in den Tubuli seminiferi sichtbar.

Auch in dieser Färbung wirken der morphologische Aufbau der Tubuli, die Ausprägung der Zellstadien, die Spermatogenese und die Ausprägung der Zellstadien altersentsprechend. Immunhistochemische Reaktionen sind weder tubulär noch peritubulär sichtbar ( s. Abb. 50, 51 ).

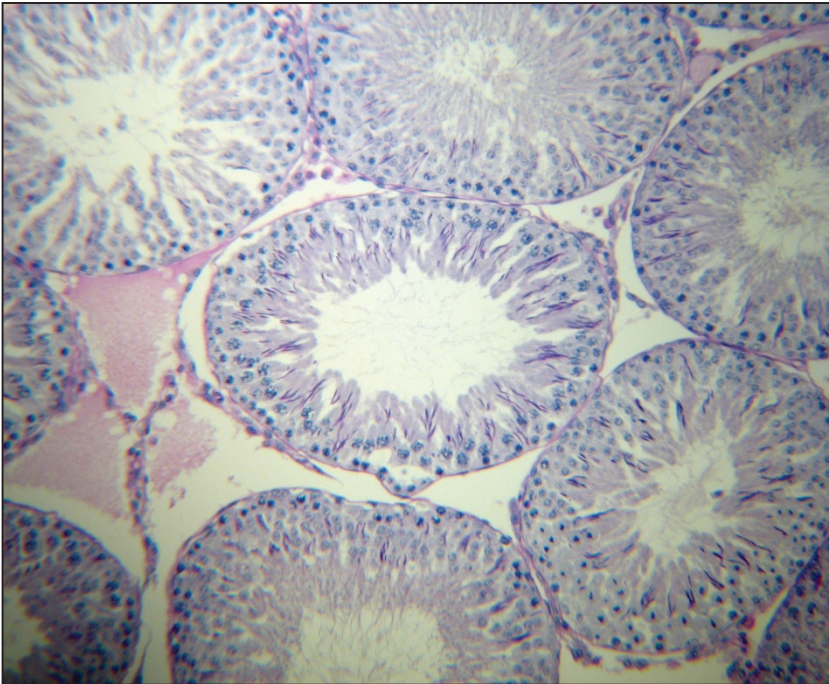
Im Gegensatz zur Kontrollgruppe sind bei den mit methimazolbehandelten Tieren adluminal vereinzelt, trotz behandlungsbedingter Veränderungen der Zellstadien der Spermatogenese, mäßig starke immunhistochemische Reaktionen z.T. in den Akrosomenkappen als auch in den runden Spermatozyten erkennbar. Im peritubulären Raum ist wie zuvor bei den unbehandelten Tieren keine immunhistochemische Reaktion nachweisbar.

### **3.2.3 Befunderhebung über die Bcl2-Immunreaktion ( Abb. 53 - 54 )**

Bei dieser Antikörper-Färbung finden sich in der der Kontrollgruppe weder morphologische Veränderungen noch eine unübliche Spermatogenese, auch die Zellstadienverteilung wirkt altersentsprechend. Eine immunhistochemische Reaktion ist in den Tubuli seminiferi und im peritubulären Raum nicht erkennbar (s. Abb. 49 ). Auch bei den behandelten Tieren, bei denen veränderte bzw. gestörte Spermatogenese-Zellstadien vorliegen, ist keine immunhistochemische Reaktion auf den Antikörper Bcl2 darstellbar.



### 3.2.4 Fotos der mit Methimazol-behandelten Tiere und deren Kontrolltiere:

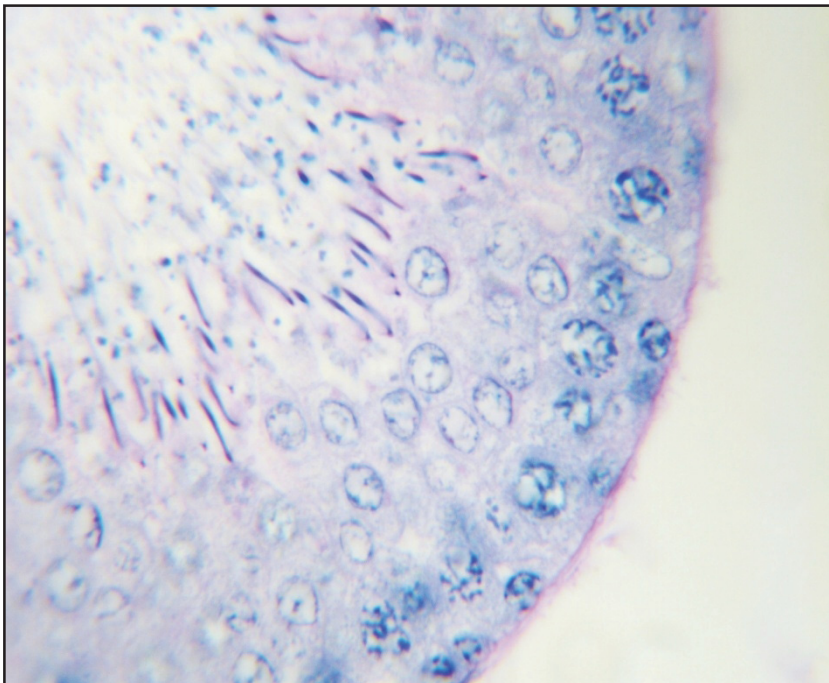


**Abb. 46**

Paraffin-Schnitt. PJS-Färbung+Hämalaun. *Kontrolltier 120 Tage alt.*

Endgültige Vergrößerung: x 180.1cm d. Abb.= 55µm

Dargestellt sind peritubulärer Raum und mehrere Tubuli seminiferi, in denen eine unauffällige Spermatogenese zu beobachten ist.

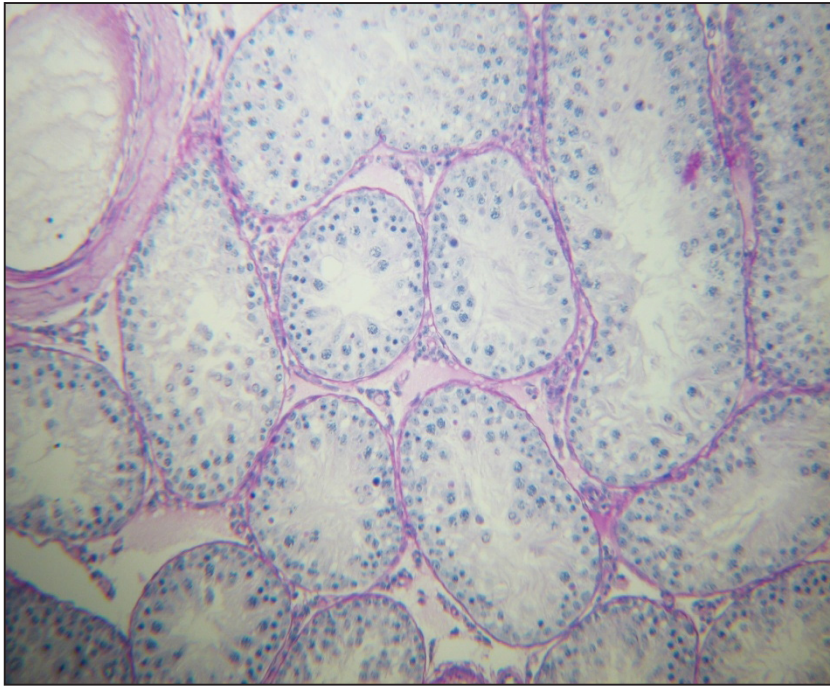


**Abb. 47**

Paraffin-Schnitt. PJS-Färbung+Hämalaun. *Kontrolltier 120 Tage alt.*

Endgültige Vergrößerung: x 180.1cm d. Abb.= 55µm.

Vergrößerung eines Tubulus seminiferus bei dem eine fortgeschrittene, unauffällige Spermatogenese im Stadium VII zu beobachten ist.



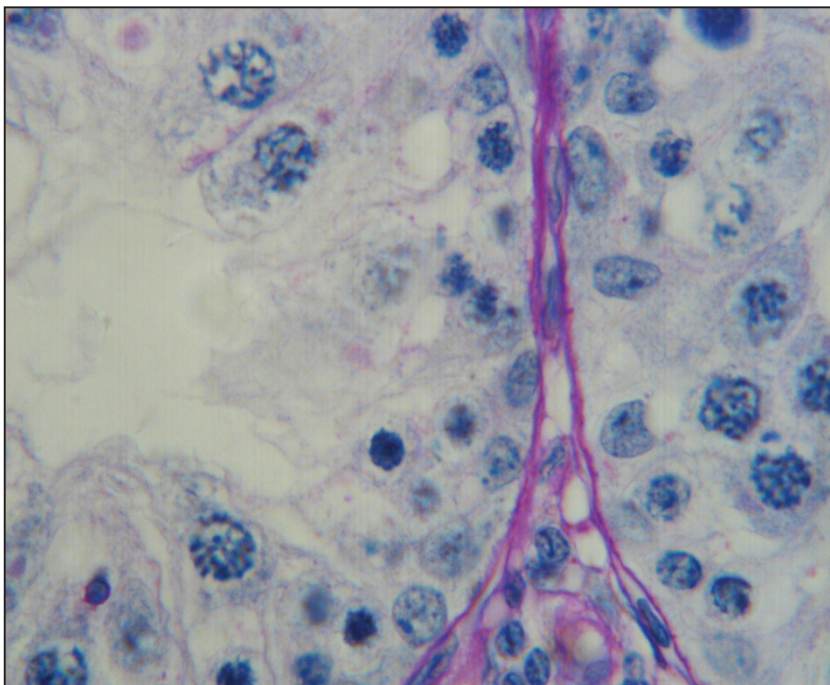
**Abb. 48**

Paraffin-Schnitt. PJS-Färbung+Hämalaun. Methimazol behandeltes Tier 120 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 180.1cm d. Abb.= 55µm

Hier ist ein Ausschnitt mehrerer Tubuli seminiferi zu sehen, die unterschiedliche Spermatogenesestadien zeigen.

Auffällig ist der geringere Durchmesser der Tubuli seminiferi im Vergleich zu denen in Abb. 42.

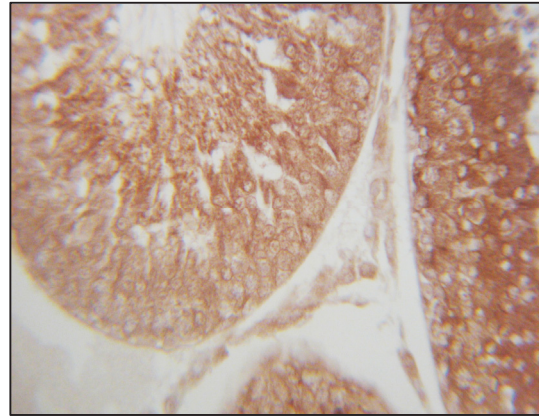
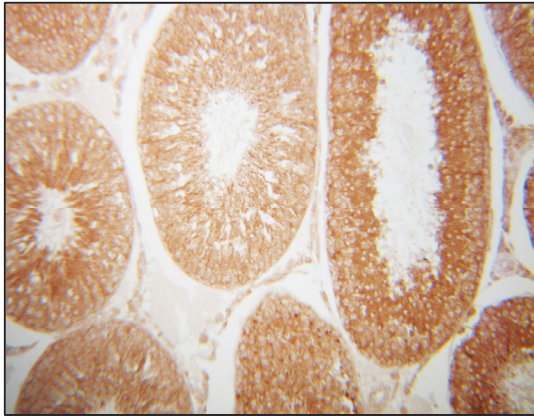


**Abb. 49**

Paraffin-Schnitt. PJS-Färbung+Hämalaun. Methimazol-behandeltes 120 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 1100.1cm d. Abb.= 17µm

Im Ausschnitt sind zwei Tubuli seminiferi zu beobachten, bei denen Spermatogonien, Sertoli-Zellen (fokal) und einige Spermatozyten vorhanden sind.



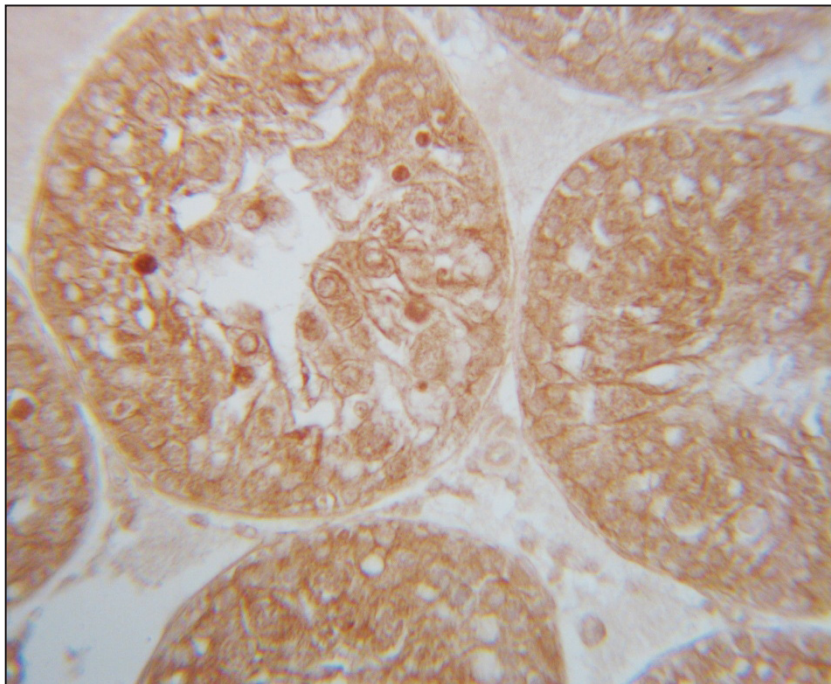
**Abb. 50 li. und Abb. 51 re.**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Caspase Reaktion. Kontrolltiere 120 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 180.1cm d. Abb.= 55µm bzw.

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27µm

Abbildung 50 und deren Ausschnittsvergrößerung 51, stellen unauffällige Spermatogenesestadien dar. Perinukleär sind keine Immunreaktionen in den Spermatozyten und Sertoli-Zellen erkennbar.

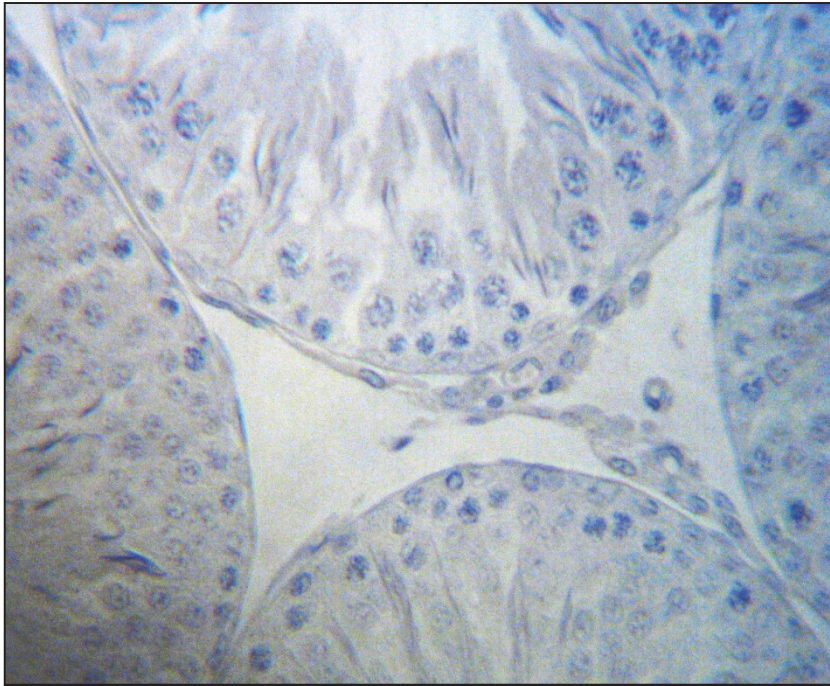


**Abb. 52**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Caspase Reaktion. Methimazolbehandeltes Tier 120 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27µm

Es sind mehrere Tubuli seminiferi dargestellt, bei denen eine z.T. starke Immunreaktionen im Kern und im Zytoplasma der Zellen sichtbar ist.

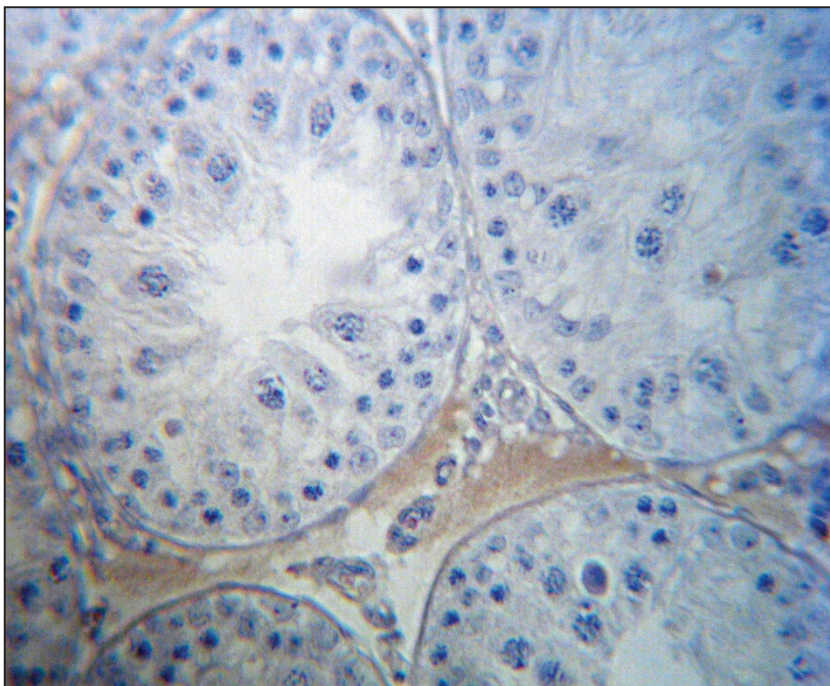


**Abb. 53**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Bcl2 Reaktion. Kontrolltier 120 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27µm

Auf diesem Ausschnitt sind vier Tubuli seminiferi und peritubulärer Raum angeschnitten. Es sind u. a. fortgeschrittene Spermatogenesestadien mit elongierten Spermien zu sehen.



**Abb. 54**

Paraffin-Schnitt. Immunhistochemische Bcl2 Reaktion. Methimazol-behandeltes 120 Tage alt.

Endgültige Vergrößerung: x 440.1cm d. Abb.= 27µm

Hier sind Tubuli seminiferi dargestellt. Im zentralen Tubuli wirken die Zellen der Spermatogenese verändert bzw. adluminal deformiert. Beachte die Lymphe im peritubulären Raum (diffus braune Präzipitate). Ein distinkte Immunreaktion ist nicht feststellbar.

## 4. Diskussion

### 4.1 Besprechung der Befunde über DEHP

Zu den Hauptbefunden dieser Arbeit zählen u. a. die kleineren Querdurchmesser der Hoden bei den behandelten Tieren, die strukturelle Veränderungen bis zum Verlust der Spermatogenezellen und die Abnahme der Sertoli-Zellzahl-Ausprägung mit zunehmendem Alter bei den verschiedenen Versuchstiergruppen.

In der Fachliteratur sind eine Vielzahl von DEHP- hervorgerufenen Wirkungen auf die Reproduktionsorgane beschrieben. Populationsstudien von *Eveillard et al.* (2009) zeigen Verbindungen zwischen Phthalat-Exposition und Entwicklung des Reproduktionstraktes. Dies beschreiben auch *Andrade et al.* (2006), indem sie darauf verweisen, dass es durch DEHP-Einfluss zu Abnormitäten der Reproduktionsorgane wie z.B. Kryptorchismus (= Lageanomalie des Hodens) kommt. Das vermutet auch *Sharpe* (2001;2003), der eine Erhöhung der Östrogenwerte für den Kryptorchismus und die verringerte Spermienproduktion verantwortlich macht. Diese werden durch Langzeitapplikation von DEHP über Freisetzung von Luteinisierendem Hormon und Steigerung des Estradiolspiegels erzeugt (*Akingbemi et al.*, 2001). Hierzu passen die Beobachtungen von *Singh et al.* (1974), die Infertilität bei Mäusen nach DEHP-Behandlung beschreiben.

Die Keimzellabnahme nach DEHP-Gabe beginnt schon in-utero bzw. durch die Aufnahme über die Muttermilch (*Sharpe et al.*, 1995). Eine verzögerte Keimzellentwicklung bei Untersuchungen mit Vertretern der Phthalatgruppe ist fetal wie auch postnatal zu beobachten (*Ferrara et al.*, 2006).

*Kollmer* (2008; 2009) beschreibt einen DEHP-induzierten Verlust von Keimzellen, besonders bei den über einen längeren Zeitraum (30Tage) behandelten Tieren. Sie stützt ihre These über die ausgeprägte Vakuolisierung, die für ein Herauslösen der Keimzellen aus dem Zellverband spricht. Auch *Kasahara et al.* (2002) haben die vakuolisierunginduzierende Wirkung von DEHP feststellen können, allerdings auf Sertolizellen.

Das Auftreten der Vakuolen nach DEHP-Behandlung kann auch anhand der vorliegenden Arbeit belegt werden. Dies beschreiben auch *Foster et al.* (1982) und *Creasy et al.* (1983), die gezeigt haben, dass Phthalat-Behandlung zu

Vakuolisierung und degenerativen Veränderungen in Sertoli-Zellen, zu Spermatozyten und Spermatisiden führt.

Wie in der vorliegenden Arbeit beobachtet, beschreiben auch *Park et al.* (2002) durch DEHP induzierte Apoptose, Nekrose und eine Verringerung der Keimzellzahl, was eine morphologische Reduktion bzw. Atrophie des Hodens zur Folge hat. *Ono et al.* (2004) haben nach der DEHP-Behandlung ein basales Vorkommen in den Tubuli seminiferi von kornähnlichen Strukturen beobachtet, speziell im Endoplasmatischen Retikulum, den Mitochondrien der Sertoli-Zellen, im Golgi-Apparat und in den Lysosomen der Sertoli-Zellen. Auch sind die Körner (= Granula) an den Schnittstellen der Sertoli-Zellen untereinander und bei denen mit den Spermatozyten aufgetaucht. In weiteren Versuchen nach 24h hat die Körner-Dichte abgenommen. Daraus haben *Ono et al.* (2004) geschlossen, dass sich Phthalat-Ester - wie DEHP - schnell im Körper aufspalten und sich nur die saure Hälfte des Phthalats in der Zelle verteilt. Sie weisen darauf hin, dass der Mechanismus der toxischen Wirkung der Phthalate auf den Hoden nicht vollkommen geklärt sei, wohingegen ihr Effekt auf Sertoli-Zellen und die Schädigung der Bluthodenschranke bereits von *Gray and Butterworth* (1980) untersucht wurden und von *Ono et al.* (2004) mit radioaktiv markiertem DEHP gezeigt wurde, dass DEHP die Blut-Hodenschranke überwinden kann.

Zu dem Mechanismus der Aufspaltung von Di-Estern zu ihren Metaboliten Mono-Estern, in diesem Falle MEHP, existieren Untersuchungen von *Gray and Gangolli* (1986) und *Thomas, Thomas and Gangolli* (1984), die testikuläre Veränderungen durch DEHP oder MEHP beschreiben. Hier ergibt sich eine Bestätigung der Befunde dieser Arbeit.

Erwähnenswert sind auch Untersuchungen von *Schulz und Rubin* (1973). Sie berichten, dass 80% des von ihnen <sup>14</sup>C-markierte DEHP bereits nach 24h wieder ausgeschieden werden. Ähnliches zeigen die Versuche von *Williams and Blanchfield* (1974) die nach 24h keine Radioaktivität haben nachweisen können. Im Gegensatz dazu ermitteln *Gaunt and Butterworth* (1982) einen radioaktiven Peak nach 4h, danach nahm die radioaktive Konzentration ab, außer im kleinen Becken. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Organe in dieser Region des Körpers länger einer größeren toxischen Phthalatwirkung ausgesetzt sind.

*Daniel* (1978) sprechen von enterohepatischer Zirkulation: Er kann nach Behandlung mit radioaktivmarkiertem DEHP nach 4 Tagen noch Radioaktivität in der Galle nachweisen.

Speziell auf die Veränderungen bei den Sertoli-Zellen gehen *Lori A. Dostal et al.* (1988) ein. Neonatalen und adulten Tieren wurden täglich 5 Dosen DEHP verabreicht, die histologischen Untersuchungen wurden 24h nach der letzten Gabe durchgeführt. Bei 1 Woche alten Ratten zeigte sich eine 35% Abnahme der Sertoli-Zellen. 2 und 3 Wochen alte Ratten verloren die Spermatozyten, nicht aber die Sertoli-Zellen. 6 und 12 Wochen alte Tiere zeigten den Verlust von Spermatisden und Spermatozyten. Diese Befunde korrespondieren mit den Ergebnissen dieser Arbeit.

Weiter kommt die Arbeit von *Lori A. Dostal et al.* (1988) zu dem Ergebnis, dass Sertoli-Zellen das primäre Ziel der Wirkung von Phthalaten sind. Zudem wird beschrieben, dass die hervorgerufenen Veränderungen nicht anhaltend seien in Bezug auf Fertilität, Implantationsrate und Anzahl der lebenden Feten. Im weitesten Sinne wird allerdings eingeräumt, dass die Abnahme der Spermatisden wohl dosisabhängig sei. Ähnliches fanden *Gray and Beaman* (1984) heraus: Nach 10tägiger DEHP-Exposition bei nicht geschlechtsreifen Ratten kam es zu Atrophie der Hoden, jedoch zur Normalisierung nach 17 Wochen.

In diesem Zusammenhang stellt sich ein weiterer Diskussionspunkt zu dieser aktuellen Arbeit, und zwar in Bezug auf das Ausmaß durch die DEHP-Behandlung hervorgerufenen morphologischen Veränderungen. Wie aus den vorliegenden Befunden hervorgeht, stellt sich bei dem hier sichtbaren Ausmaß der Veränderungen bzw. Schädigung die Frage, ob eine intakte Funktion der Hoden möglich sein könne. Weitere Erkenntnisse über die schädigende Wirkung von Phthalat-Estern dokumentieren bereits *Gray et al.* (1977), *Oishi and Hiraga* (1979), *Foster et al.* (1980). Sie stellen bei adulten Ratten unter Phthalat-Einfluss eine Atrophie der Tubuli seminiferi, Verlust der Keimzellen und strukturelle Veränderungen im Cytoplasma der Sertoli-Zellen fest.

*Kuramori et al.* (2009) beschreiben, dass hohe Dosen DEHP Keimzellentod bei männlichen Nagetieren hervorrufen und dass MEHP, welches ein Metabolit des DEHP ist, verantwortlich für testikuläre Toxizität ist. Laut *Song et al.* (2008) kann es zu morphologischen Veränderungen in Leydigzellkulturen kommen. *Culty et al.* (2008) berichten von der Abnahme des absoluten Volumens an Leydigzellen, und

im Serum der Versuchstiere weisen sie eine signifikant reduzierte Testosteron-Konzentration nach. Ähnliches beobachteten auch *Mahood et al. (2005)*, die eine Größenabnahme der Leydig-Zellen und in Abhängigkeit dazu reduzierte Testosteronspiegel feststellten.

Bei den vorliegenden Untersuchungen an Rattenhoden zuvor u.a. mit DEHP behandelte Tiere sollten mögliche immunhistochemische Reaktionen durch Anfärbung mit bestimmten Anti-Körper gezeigt werden.

Als erstes fiel der bereits optisch wahrnehmbare Unterschied im Durchmesser der Schnitte zwischen behandelten und unbehandelten Tieren auf.

Weiter sind starke morphologische Veränderungen auf Grund der DEHP-Behandlung nachweisbar gewesen, diese haben eine Stadieneinteilung z.T. nicht möglich gemacht, denn es ist zum Ausbleiben von charakteristischen Zellorganellen und Spermatozyten-Vorstufen gekommen.

Ein wesentlicher Befund ist der zunehmende Unterschied in der Sertoli-Zell-Ausprägung zwischen den Versuchstiergruppen mit zunehmendem Alter.

Die Phthalate schädigen die Sertoli-Zellen, die nur eine bestimmte Anzahl von Spermatozyten ernähren können, dadurch kommt es zur Verringerung der Spermienproduktion (*Orth et al., 1988; Sharpe, 2001; Li & Kim, 2003*).

*Cammack et al. (2003)* stellen fest, dass eine i.v. Gabe keine Schädigung der Sertoli-Zellen hervorruft.

In der Cleaved-Caspase 3-Reaktion ist bei den unbehandelten Tieren eine adluminal Reaktion in den sekundären und runden Spermatozyten sichtbar geworden. Zudem hat sich eine Anfärbung der Akrosomenkappen gezeigt. Bei den behandelten Tieren hat die intratubuläre Reaktion im Vergleich zu den unbehandelten stärker gewirkt.

Bei der Untersuchung der Häufigkeit der Ausprägung der Stadienpaare der Spermatogenese hat sich bei den behandelten Tieren eine starke Ausprägung gezeigt, die stärkste von Paar XI-XII, darauf folgten XIII-XIV und IX-X.

Bei den unbehandelten Tieren ist es auch zu stärkster Ausprägung von XI-XII gekommen, im Vergleich zu den behandelten Tieren ist es aber zu einem anderen Verteilungsmuster der Stadienausprägung gekommen.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten korrespondieren mit den oben genannten Befunden anderer Autoren und führen zu der Schlussfolgerung, dass DEHP einen



beeinträchtigenden Einfluss auf Reproduktionsorgane und direkt auf die Spermatogenese hat. DEHP wirkt sich, in Abhängigkeit von der Dosis, auf die Ausprägung der Keimzellreihe in der Spermatogenese und auf die Anzahl der Sertoli-Zellen aus.

#### **4.2 Besprechung der Befunde über Methimazol**

Bei Methimazol handelt es sich um ein Arzneimittel, welches als Thyreostatika seine Verwendung in der Behandlung der Hyperthyreose findet. Es inhibiert die Bindung zwischen Iod und dem Enzym Thyreoperoxidase, auf diese Weise unterbindet Methimazol die Bildung der aktiven Schilddrüsenhormone Thyroxin und Triiodthyronin (*Weng et al., 2007 u. Maran u. Aruldas, 2002*).

Auch bei Untersuchungen dieser Arbeit zu den Methimazol behandelten Tieren fällt ein Größenunterschied im Bezug auf den Durchmesser der Hoden von behandelten und unbehandelten Tieren auf.

Es kommt zu adluminalen Veränderungen der Spermatogenesestadien.

Ein größerer Unterschied zwischen den Gruppen im Bezug auf die Ausprägung der Sertoli-Zellen ist evident. Die Kontrolltiere weisen deutlich mehr Sertolizellen auf.

In der Cleaved-Caspase3-Reaktion werden immunhistochemische Reaktionen in den Akrosomenkappen und den runden Spermatisden sichtbar.

Bei der BC12-Reaktion sind für beide Versuchstiergruppen keine immunhistochemischen Reaktionen nachweisbar.

*Weng et al. (2007)* beschreiben nach der Behandlung mit Methimazol, bei der ein Hypothyroidismus induziert worden ist, einen signifikanten Anstieg des Gewichtes von Körper und Hoden. Weiter verweisen sie auf den Anstieg von Thyroidhormonen, Kortison, Testosteron im Plasma. Auf Grund ihrer Untersuchungen kommen sie zu dem Ergebnis, dass Thyroidhormone essentiell für eine normale Spermatogenese sind. Wobei bei sie abschließend offen lassen, ob ihr Einfluss direkt oder indirekt sei.

*Maran and Aruldas (2002)* finden heraus, dass neonataler durch Methimazolgabe induzierter Hypothyroidismus die Tubuli seminiferi und die Durchmesser der Lumen signifikant reduziert. Das Gewicht der Hoden und der Schilddrüse steigt bei allen Tieren an.

Die signifikante Abnahme des Durchmessers der Tubuli seminiferi beschreiben auch schon *Francavilla et al. (1991)* und aktuell *Kollmer (2008, 2009)*.

Die Literatur enthält widersprüchliche Angaben zu dieser Problematik:

So beschreiben einige Autoren ( *Cooke et al., 1991; 1994; Hardy et al., 1996; Kimura & Furudate, 1996*) einen Anstieg des Hodengewichtes und der adulten Spermienproduktion als Folge einer durch neonatale Hypothyreose induzierten Hodenhypertrophie. Wohingegen *Maran and Aruldas (2002)* bei verlängerter Hypothyreose von Volumenreduktion sprechen.

Als Folgen einer kongenitalen Hypothyreose beschreiben *Sakai et al. (2004)* die Entwicklungsverzögerung von Spermatozyten, Spermatiden, Apoptose von Keimzellen und eine geringere Höhengausprägung des Keimepithels.

Ähnliches stellt *Kollmer (2008, 2009)* in ihrer Arbeit fest: eine Alteration der Spermatogenese, besonders in den späten Stadien und beginnende Elongation nur bei einzelnen Spermatiden sowie stark aufgelockertes Keimepithel und Zelleritus. Hierzu schlussfolgert sie, dass die durch Methimazol bedingte Hypothyreose zu Keimzellschäden und Infertilität, auch nach Abschluss der Sexualentwicklung führt. Diese These wird von *Buzzard et al. (2000, 2003)* gestützt, die den regulierenden Faktor Schilddrüsenhormone aufzeigen, indem sie Tyroxinrezeptoren an Keimzellen und proliferierenden Sertolizellen adulter Ratten nachweisen.

Bekräftigt werden diese Ausführungen auch noch von weiteren Autoren ( *Francavilla et al., 1991; Hardy et al., 1996;*), die bei neonataler Hypothyreose eine Degeneration von Keimzellen sowie eine verlängerte Sertolizell-Proliferation beschrieben haben.

Wie aus den Untersuchungen dieser Arbeit hervorgeht, nimmt die Zahl der Sertoli-Zellen sowohl nach der Behandlung mit DEHP als auch mit MMI ab.

Es wird deutlich, dass die Quantität der Sertoli-Zellen-Ausprägung mit der Quantität der Spermienproduktion zusammenhängt. Eine Abnahme der Qualität der Sertoli-Zell-Ausprägung beeinträchtigt die Stadien der Spermatogenese und damit letztendlich die Produktion der Spermien.

Laut *Maran & Aruldas (2002)* ist Methimazol für den Stillstand bei der Proliferation und Differenzierung von Keimzellen bzw. Abnahme deren Expression verantwortlich. Als mögliche Erklärung bieten sie durch Hypothyreose bedingte Anstiege von Testosteron und des Estradiolspiegels an. Somit kommen sie zu der Erkenntnis, dass Thyroidhormone wichtig für eine normale Spermatogenese sind. Schilddrüsenhormone wirken regulatorisch auch bei der Differenzierung von Leydigzellen (*Mendis-Handagama et al., 1998*). Zuvor haben *Maran et al.* schon

2001 festgestellt, dass die Anzahl der Leydigzellen bei hypothyroiden Tieren geringer ist als bei gleichaltrigen Kontrolltieren. Einen Einfluss hat die Methimazol-Behandlung auch auf die Durchmesser der Leydigzellen gehabt, diese waren auch kleiner als bei den Kontrolltieren.

*Cristorao et al. (2002)* finden heraus, dass eine nur schwache neonatale Hypothyreose scheinbar Leydigzell-Proliferation bewirkt. Wohingegen es bei stärkerer bzw. längerer Hypothyreose zur Inhibition der Leydigzell-Proliferation kommt (*Maran et al., 2001, 2002*).

Schlussfolgernd können die o.g. Befunde der Publikation weitgehend bestätigt werden, dass Methimazol induzierte Hypothyreose zu Veränderungen in den Spermatogenesestadien führt. Es kommt zu Keimzellschäden und Infertilität. Im Zusammenhang damit steht auch die Abnahme der Sertoli-Zellzahl und indirekt die Spermienproduktion.

#### **4.3 Schlussfolgerungen**

1. Nach der DEHP-Behandlung wurde eine signifikante Abnahme der Sertoli-Zellzahl beobachtet.
2. Die Methimazol-Behandlung führte ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der Sertoli-Zellzahl.
3. Bei den mit DEHP behandelten Tieren war auf Grund des Keimepithels eine Erkennung der Spermatogenese-Stadien nicht möglich.
4. Der Apoptosemarker BCL2 ist für die Untersuchung nach DEHP – bzw. nach Methimazolbehandlung nicht geeignet.
5. Das Fehlen der Cleaved-Caspase3-Reaktion in den sekundären Spermatozyten nach der DEHP-Behandlung weist wahrscheinlich auf eine Apoptose hin.

#### **4.4 Ausblick**

Die Erkenntnisse dieser Arbeit und die umfangreichen zitierten Studien untermauern eine Gefährdung für die Reproduktionsfähigkeit des Menschen durch Phthalate, also durch sogenannte Weichmacher.

Ein möglicher zukünftiger Forschungsansatz liegt darin, den Resorbtiions-, Metabolisierungs- und Speicherungsprozess genauer zu erforschen. Hierzu könnte man eventuell mit radioaktiver Markierung des relevanten Weichmachers oder dessen Metaboliten versuchen, den Stoffwechselweg nachzuvollziehen.

Interessant wären speziell Daten über die Veränderung an der Leber als größtem Stoffwechselorgan des Körpers.

Zur Methimzol-Studie wäre auch eine Fortsetzung mit Messung der relevanten Thyroideaparameter im Blut interessant, auch hierbei wäre eine abschließende Präparation und immunhistchemische Untersuchung der Thyroidea bestimmt weiterführend.

Zudem sollte die Frage der Reproduktionsfähigkeit behandelter Tiere weiterverfolgt werden. Die Frage der eventuellen Schädigung möglicher Nachkommen nach Exposition der Elterngeneration mit Weichmachern sollte auch untersucht werden.

## Literaturverzeichnis

AKINGBEMI, B. T., YOUKER, R. T., SOTTAS, C. M., GE, R., KATZ, E., KLINEFELTER, G. R., ZIRKIN, B. R., HARDY, M. P. (2001):

Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di (2-ethylhexyl) phthalate.  
Biol Reprod, 65, 1252-1259

ANDRADE, A. J., GRANDE, S. W., TALSNESS, C. E., GERICKRE, C., GROTE, K., GOLOMBIEWSKI, A., STERNER-KOCK, A., CHAHOUD, I. (2006):

A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) reproductive effects on adult male offspring rats.

Toxicology, 228, 85-97

AYLWARD, L. L., HAYS, S. M., GAGNÉ, M., KRISHNAN, K. (2009) :

Derivation of Biomonitoring Equivalents for di(2-ethylhexyl) phthalate (CAS No. 117-81-7).  
Regul Toxicol Pharmacol, 55 (3), 249-258

BUZZARD, J. J., MORRISON, J. R., O'BRYAN, M. K., SONG, Q., WREFORD, N. G. (2000):

Development expression of thyroid hormone receptors in the rat testis.  
Biol Reprod, 62, 664-669

BUZZARD, J. J., WREFORD, N. G., MORRISON, J. R. (2003):

Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat Sertoli cells.

Endocrinology, 144, 3722-3731

CAMMACK, J. N., WHITE, R. D., GORDON, D., HASS, J., HECKER, L., CONINE, D., BRUEN, U. S., FRIEDMAN, M., ECHOLS, C., YEH, T. Y., WILSON, D. M. (2003):

Evaluation of reproductive development following untravenous and oral exposure to DEHP in male neonatal rats.

Int J Toxicol, 22, 159-174

COOKE, P. S., YOUNG, P., and CUNHA, G.. R. (1991):

Androgen receptor expression in developing male reproductive organs.  
Endocrinology, 128, 2867-2873

COOKE, P. S., HESS, R. A., PORCELLI, J., MEISAMI, E. (1991):

Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism.  
Endocrinology, 129, 244-248

COOKE, P. S., ZHAO; Y., BUNICK, D. (1994):

Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: Possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment.

Biol Reprod, 51, 1000-1005

CREASY, D. M., FOSTER, J. R. and FOSTER, P. M. D. (1983):

The morphological development of di-n-pentyl phthalate induced testicular atrophy in the rat.

J Pathol, 139, 309-321

CRISTOVAO, F. C., BISI, H., MENDONCA, B. B., BIANCO, A. C., BLOISE, W.: (2002): Severe and mild neonatal hypothyroidism mediate opposite effects on Leydig cells of rats. *Thyroid*, 12, 13-18

CULTY, M., THUILLIER, R., LI W., WANG, Y., MARTINEZ-ARGUELLES, D. B., BENJAMIN, C. G., TRIANTAFILOU, K. M., ZIRKIN, B. R., PAPADOPOULOS, V. (2008):

In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exerts both short-term and long-lasting suppressive effects on testosterone production in the rat.

*Biol Reprod*, 78, 1018-1028

DANIEL, J. W. (1978):

Toxicity and metabolism of phthalate esters.

*Clin Toxicol*, 13, 257-268

DE SCHEPPER, J., BELVA, F., SCHIETTECATTE, J., ANCKAERT, E., TOURNAYE, H., BONDUELLE, M. (2009) :

Testicular growth and tubular function in prepubertal boys conceived by intracytoplasmic sperm injection.

*Horm Res*, 71 (6), 359-363

DOSTAL, Lori A., CHAPIN, Robert R., STEFANSKI, Steven A., HARRIS, Martha W., and SCHWETZ, Bernard A. (1988):

Testicular Toxicity and Reduced Sertoli Cell Numbers in Neonatal Rats by Di(2-ethylhexyl) Phthalate and the Recovery of Fertility as Adults.

*Toxicol Appl Pharmacol*, 95, 104-121

DRAKE, A. J., VAN DEN DRIESCHE, S., SCOTT, H. M., HUTCHISON, G. R., SECKL, J. R., SHARPE, R. M. (2009):

Glucocorticoids amplify dibutyl phthalate-induced disruption of testosterone production and male reproductive development.

*Endocrinology*, 150 (11), 5055-5064

EVEILLARD, A., LASSERRE, F., de Tayrac, M., POLIZZI, A., CLAUS, S., CANLET, C., MSELLI-LAKHAL, L., GOTARDI, G., PARIS, A., GUILLOU, H., MARIN, P. G., PINEAU, T.: (2009):

Identification of potential mechanisms of toxicity after di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) adult exposure in the liver using a system biology approach.

*Toxicol Appl Pharmacol*, 236 (3), 282-292

FERRARA, D., HALLMARK, N., SCOTT, H., BROWN, R., MCKINNEELL, C., MAHOOD, I. K., SHARPE, R. M. (2006):

Acute and long-term effects of in utero exposure of rats to di(n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation.

*Endocrinology*, 147, 6352-5362

FOSTER, P. M., THOMAS, L. V., COOK, M. W. GANGOLLI, S. D. (1980):

Study of the testicular effects and changes in zinc excretion produced by some n-alkyl phthalates in the rat.

Toxicol Appl Pharmacol, 54 (3), 392-398

FOSTER, P. M., FOSTER, J. R., COOK, M. W., THOMAS, L. V., GANGOLLI, S. D. (1982):

Changes in ultrastructure and cytochemical localization of zinc in rat testis following the administration of di-n-pentyl phthalate.

Toxicol Appl Pharmacol, 63 (1), 120-132

FRANCAVILLA, S., CORDESCHI, G., PROPERZI, G., DI CICCO, L., JANNINI, E. A., PALMERO, S., FUGASSA, E., LORAS, B., D'ARMIENTO, M. (1991):

Effect of thyroid hormone on the pre- and post-natal development of rat testis.

J Endocrinol, 1129, 35-42

GAUNT, I. F. and BUTTERWORTH, K. R. (1982):

Autoradiographic study of orally administered di-(2-ethylhexyl) phthalate in the mouse.

Food Chem. Toxicol., 20, 215-217

GRAY, T. J., BUTTERWORTH, K. R., GAUNT, I. F., GRASSO, G. P. and GANGOLLI, S. D. (1977):

Short-term toxicity study of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats.

Food Cosmet Toxicol, 15, 389-399

GRAY, T. J. and BUTTERWORTH, K. R. (1980):

Testicular atrophy produced by phthalate esters.

Arch Toxicol Suppl, 4, 452-455

GRAY, T. J., BEAMAND, J. A. (1984):

Hepatic effects of phthalate esters and related compounds.

Pub Med, 54 (3) 167-176

GRAY, T. J., BEAMAND, J. A. (1984):

Effect of some phthalate esters and other testicular toxins on primary cultures of testicular cells.

Food Chem Toxicol, 22 (3) 123-131

GRAY, T. J. and GANGOLLI, S. D. (1986):

Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters.

Environ Health Perspect, 65, 229-235

GUMINSKA, A., SLOWIKOWSKA-HILCZER, J., KRUZANSKI, W., SOSNOWSKI, M., OSZUKOWSKA, E., MARCHLEWSKA, K., WALCZAK-JEDRZEJOWSKA, R., NIEDZIELSKI, J., KILA, K. (2007):

Features of impaired seminiferous tubule differentiation are associated with germ cell neoplasia in adult men surgically treated in childhood because of cryptorchidism.

Folia Histochem Cytobio, 145, Suppl., 163-168

HARDY, M. P., SHARMA, R. S., ARAMBEPOLA, N. K., SOTTAS, C. M., RUSSEL, L. D., BUNICK, D., HESS, R. A., COOKE, P. S. (1996):

Increased proliferation of Leydig cells induced by neonatal hypothyroidism in the rat.

J Androl, 17, 231-238

- HAUSER, R., MEEKER, J. D., SINGH, N. P., SILVA, M. J., RYAN, L., DUTY, S., CALAFAT, A. M. (2007):  
DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites.  
Hum Reprod, 22 (3), 688-695
- HESS, R: A.(1990):  
Quantitative and Qualitative Characteristics of the Stages and Transitions in the Cycle of the Rat Seminiferous Epithelium: Light Microscopic Observations of Perfusion-Fixed and Plastic-Embedded Testes.  
Biology of Reproduction, 43, 525-542
- KASAHARA; E., SATO, E. F., MIYOSHI, M., KONAKA, R.I., HIRAMOTO, K., SASAKI, J., TOKUDA, M., NAKANOS, Y., and INOUE, M. (2002):  
Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate.  
Biochem J, 365, 849-856
- KIMURA, T., FURUDATE, S. (1996):  
Pituitary and prolactin deficiency and testis enlargement in hypothyroid rats caused by goitrogen methimazole.  
Exp Anim, 45, 369-375
- KOLLMER, J. (2008; 2009):  
Immunohistochemische Untersuchungen zu den Wirkungen von einem Xenoestrogen (Di-2-ethylhexylphthalat) bzw. einem Thyreostatikum (Methimazol) auf Hodengewebe bei Ratten.  
Düsseldorf 2009 (2008 Diss. bei Prof. S. G. Haider)
- KURAMORI , C., HASE, Y., HOSHIKAWA, K., WATANABE, K., NISHI, T., HISHIKI, T., SOGA, T., NASIMOTO, A., KABE, Y., YAMAGUCHI, Y., WATRANABE, H., KATAOKA, K., DUEMATSU, M., HANDA, H. (2009):  
Mono-(2-ethylhexyl) phthalate targets glycogen debranching enzyme and affects glycogen metabolism in rat testis.  
Toxicol Sci, 109 (1), 143-151
- LAGUË, E., TREMBLAY, J. J. (2008):  
Antagonistic effects of testosterone and the endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate on INSL 3 transcription in Leydig cells.  
Endocrinology, 149 (9), 4688-4694
- LEBLOND, C. P., CLERMONT, Y. (1952):  
Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat.  
Ann. N. Y. Acad. Sci., 55, 548-573
- LI, H., KIM, K. H. (2003):  
Effects of mono-2-ethylhexyl phthalate on fetal and neonatal rat testis organ cultures.  
Biol Reprod, 69, 1964-1972
- LI, H., XU, L., DUNBAR, J. C., DHABUWALAA, C. B. (2003):  
Role of mitochondrial cytochrome c in cocaine-induced apoptosis in rat testes.  
Urology, 61, 646-650



LÖFFLER, G., PETRIDES, P. E. (2003):

Biochemie und Pathobiochemie.

Siebte, völlig neu bearbeitete Auflage. Heidelberg: Springer, S. 871-880; 888-894

MAHMOUD, A., KISS, P., VANHOORNE, M., DE BACQUER, D., COMHAIRE, F. (2005):

Is inhibin B involved in the toxic effect of lead on male reproduction?

Int J Androl, 28 (3), 150-155

MAHOOD, K., HALLMARK, N., MCKINNELL, C., WALKER, M., FISHER, J. S., SHARPE, R. M. (2005):

Abnormal Leydig cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to di (n-butyl) phthalate and its possible role in testicular dysgenesis.

Endocrinology, 146, 613-623

MARAN, R. R., RAVICHANDRAN, K., ARUNAKARAN, J., ARULDHAS, M. M. (2001) :  
Impact of neonatal hypothyroidism on Leydig cell number, plasma, and testicular interstitial Fluid sex steroids concentration.

Endocr Res, 27, 119-141

MARAN, R. R., ARULDHAS, M. M. (2002):

Adverse effects of neonatal hypothyroidism on Wistar rat spermatogenesis.

Endocr Res, 28, 141-154

MEEKER, J. D., CLAFAT, A. M., HAUSER, R. (2009):

Urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate are associated with decreased steroid hormone levels in adult men.

J Androl, 30 (3), 287-297

MENDIS-HANDAGAMA, S. M. L. C., ARIYARATNE, H. B. S., TEUNISSEN VAN MANEN, K. R., HAUPT, R. L. (1998):

Differentiation of adult Leydig cells in the neonatal rat testis is arrested by hypothyroidism.

Biol Reprod, 59, 351-357

MIGLIARINI, B., PICCINETTI, C. C., MARADONA, F., GIOACCHINI, G., CARNEVALI, O. (2010, 2011):

Perspectives on endocrine disruptor effects on metabolic sensors.

Gen Comp Endocrinol, 170 (3), 416-423

NIESCHLAG, E., BEHRE, H. M., NIESCHLAG, S. (2009):

Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction.

3<sup>rd</sup>, Completely Revised and Updated Edition. New York: Springer

OISHI, S., HIRAGA, K. (1979):

Effect of phthalic acid esters on gonadal function in male rats.

Bull Environ Contam Toxicol, 21, 65-67

ONO, H., SAITO, Y., IMAI, K., and KATO, M. (2004):

Subcellular Distribution of DI-(2-Ethylhexyl)Phthalate in Rat Testis.

The Journal of Toxicological Science, Vol. 29, No. 2, 113-124.

ORTH, J. M., GUNSALUS, G. L., LAMPERTI, A. A. (1988):  
Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development.  
Endocrinology, 122, 787-794

PALMERO, S., DE MARCHIS, M., GALLO, G., FUGASSA, E. (1989):  
Thyroid hormone affects the development of Sertoli cell function in the rat.  
J Endocrinol 123, 105-111

PARK, J. D., HABEEBU, S. S., KLAASSEN, C. D. (2002):  
Testicular toxicity of di-2-ethylhexyl phthalate in young Sprague-Dawley rats.  
Toxicology, 171, 105-115

SAWA, M., OISHI, K. (1989):  
Delayed sperm injection and fertilization in parthenogenetically activated insect egg (Athalia rosae, Hymenoptera).  
Development genes and evolution, 198, 242-244 (??)

SAKAI, Y., YAMASHINA, S., FURUDATE, S. (2004):  
Development delay and unstable state of the testes in the rdw rat with congenital hypothyroidism.  
Dev Growth Differ, 46, 327-334

SCHULZ, C. O. and RUBIN, R. J. (1973):  
Distribution, metabolism and excretion of di-2-ethylhexyl phthalate in the rat.  
Environ Health Perspect, 3, 123-129

SCOTT; H.M., HUTCHISON G.R., JOBLING M.S., MCKINNELL C., DRAKE A.J., SHARPE, R.M. (2008):  
Relationship between androgen action in the 'male programming window', fetal Sertoli cell number and adult testis size in the rat.  
Endocrinology 149: 5280-5287

SHARPE, R. M., FISHER, J. S., MILLAAR, M. M., JOBLING, S., SUMPTER J. P. (1995):  
Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production.  
Environ Health Perspect, 103, 1136-1143

SHARPE, R. M. (2001):  
Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals.  
Toxicology Letters, 120, 221-232

SHARPE, R. M. (2003):  
The oestrogen hypothesis – where do we stand now?  
Int J Androl, 26, 2-15

SHARPE, R. M. (2009):  
Male Reproductive Health Disorders and the Potential Role of Exposure to Environmental Chemicals.  
CHEM Trust publications on Male Reproductive Health

- SINGH, A. R., LAWRENCE, W. H., AUTIAN, J. (1974):  
Mutagenic and antifertility sensitivities of mice to di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and dimethoxyethyl phthalate (DMEP).  
Toxicol Appl Pharmacol, 29 (1), 35-46
- SONG, X. F., WEI, G. H., LIU, X., ZHANG, D. Y., CHEN, X., DENG, Y. J. (2008):  
Effects of diethylhexyl phthalate (DEHP) on INSL3 mRNA expression by Leydig cells derived from mouse embryos and in newborn mice.  
J Int Med Res, 36, 512-521
- SWAN, S. H., LIU, F., HINES, M., KRUSE, R. L., WANG, C., REDMON, J. B., SPARKS, A., WEISS, B. (2009, publ. 2010):  
Prenatal phthalate exposure and reduced masculine play in boys.  
Int J Androl, 33, 259-269
- THOMAS, J. A., THOMAS, M. J. and GANGOLLI, S. D. (1984):  
Biological effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate acid esters.  
Crit Rev Toxicol, 13, 283-317
- THOMASZ, L., OGLIO, R., RIVANDEIRA, D. T., DAGROSA, M. A., JAHN, G., PIGNATARO, O., SARTORIO, G., PISAREV, M. A., JUVENAL, G. J. (2009; 2010):  
Inhibition of goiter growth and of cyclic AMP formation in rat thyroid by 2-iodohexadecanal.  
Mol Cell Endocrinol 317, 141-147
- UMWELTBUNDESAMT (UBA) (2003):  
Leitfaden zur Anwendung umweltverträglicher Stoffe für die Hersteller und gewerblichen Anwender gewässerrelevanter Chemischer Produkte. Teil 5: Hinweise zur Substitution gefährlicher Stoffe. 5.1 Weichmacher.
- UMWELTBUNDESAMT (UBA) – RAL – Deutsches Institut für Gütesicherung und Kennzeichnung e. V. (2005):  
Ratgeber Blauer Engel – Gesundes Wohnen. Informationsbroschüre.
- UMWELTBUNDESAMT (UBA). Pressestelle (Hg.) (2007):  
Phthalate – nützliche Weichmacher mit den unerwünschten Eigenschaften. Empfehlung des Umweltbundesamts zum schrittweisen Ersatz.  
Presse-Informationen 003/2007, 1-24.
- WELSH, M., SAUNDERS, P. T. K., FISKEN, M., SCOTT, H. M., HUTCHISON, G. R., SMITH L. B., SHARPE, R. M. (2008):  
Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism.  
J Clin Invest, 118, 1479-1490
- WENG, Q., SAITA, E., WATANABE, G., TAKAHASHI, S., SEDQYAR, M., SUZUKI, A K, TANEDA, S., TAYA, K. (2007):  
Effect of methimazole-induced hypothyroidism on adrenal and gonadal functions in male Japanese quail (*Coturnix japonica*).  
J Reprod Dev, 53 (6), 1335-1341
- WILLIAMS, D. T. und BLANCHFIELD, B. J. (1974):

Retention, excretion and metabolism of di-(2-ethylhexyl)phthalate administered orally to the rat.

Bull Environ Contam Toxicol, 12, 109-112

WIRTH, J. J., ROSSANO, M. G., POTTER, R., PUSCHECK, E., DALY, D. C., PANETH, N., KRAWETZ, S. A., PROTAS, B. M., DIAMOND, M. P. (2008):

A pilot study associating urinary concentration of phthalate metabolites and semen quality. Syst Biol Reprod Med, 54 (3), 143-154

WOLF, C.J., LEBLANC, G.A., OSTBY, J.S., GRAY, L.E. Jr. (2000):

Characterization of the period of sensitivity of fetal male sexual development to vinclozolin. Toxicol Sci 55: 152-161

ZHANG, YH, LIN, L., LIU ZW, JIANG, XZ, CHEN, BH (2008):

Disruption effects of monophthalate exposures on inter-Sertoli tight junction in a two-compartment culture model.

Environ Toxicol, 23 (3), 302-308

Die Genehmigungen zur Verwendung der Infoblätter seitens der Herstellerfirmen liegen vor:

- Infoblatt für „Cleaved Caspace-3 # 9664

- Infoblatt für BCL 2 – DAKO. Monoclonal Mouse. Anti-Human BCL2 Oncoprotein 124  
Code M0887

## 6. Zusammenfassung

Name des Doktoranden: BUSCH, Jan Hendrik

Titel:

### **Die Wirkung von DEHP und Methimazol auf die Sertoli-Zellanzahl und Apoptose-Vorgänge im Rattenhoden**

**Ziel:** Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit histologischen sowie immunhistochemischen Methoden die Wirkung von Weichmachern ( Beispiel: DEHP ) und Thyreostatika ( Beispiel: Methimazol ) auf die Spermatogenese zu untersuchen, wobei der Schwerpunkt auf der Sertoli-Zellzahl und auf der Apoptose lag.

**Material und Methoden:** Es wurden 20 Tage alte Albinoratten in eine Kontrollgruppe und in eine Gruppe, die 10, 20, 30 Tage mit *DEHP* behandelt und anschließend untersucht wurden. Insgesamt wurden je 16 Kontroll- und Versuchstiere verwendet. Als Untersuchungsmaterial wurden die Hoden der Tiere verwendet und 5 µm dicke Schnitte gefertigt. Für den *Methimazol-Versuch* wurden 3 Monate alte männliche Albinoratten verwendet. Diese sind in 2 Gruppen zu je 5 Tieren eingeteilt worden. Die eine wurde 30 Tage mit dem Antithyroid Methimazol behandelt, die andere diente als Kontrolltier-Gruppe. Zur histologischen Darstellung der Schnitte wurde PJS gewählt. Für die apoptotischen Vorgänge wurden die immunhistologischen Reaktionen von cleaved Caspase3 und BCL2 verwendet.

**Befunde:** Die erhobenen Befunde über den *DEHP-Versuch* ergaben eine Abnahme der Querdurchmesser des Hodenschnittes bei den behandelten Tieren und einen Verlust der runden Spermatozoen und elongierten Spermatozoen. Eine Erkennung der Spermatogenese-Stadien war nicht möglich. Die Anzahl der Sertoli-Zellen nahm bei den behandelten Tieren signifikant ab. Die Cleaved-Caspase3-Reaktion machte deutlich, dass sich die immunhistochemische Aktivität ausschließlich in den sekundären Spermatozoen und Spermatozoen stattfand, und diese bei den Behandelten nur in den Spermatozoen vorhanden war. Die BCL2-Reaktion war bei den behandelten Tieren auf Grund der stark ausgeprägten morphologischen Veränderung nur bedingt auswertbar. In der Kontrolltiergruppe ließ sich aber eine starke Aktivität in den Akrosomenkappen und runden Spermatozoen feststellen. Es fiel auf, dass nach der *DEHP-Behandlung* das Stadienpaar XI-XII der Spermatogenese in der Häufigkeit dominierte.

In der Methimazol-Studie wurde auch eine Abnahme im Querdurchmesser des Hodenschnittes ersichtlich. Es zeigte sich eine deutlich geringe Ausprägung der Sertoli-Zellzahl bei den mit Methimazol behandelten Tieren. Bei Darstellungen mit Cleaved-Caspase3 kam es nur bei den behandelten Tieren zu einer Reaktion. Eine immunhistochemische Reaktion mit BCL2 konnte bei keiner der beiden Versuchstiergruppen festgestellt werden.

### **Schlussfolgerungen:**

1. Nach der DEHP-Behandlung wurde eine signifikante Abnahme der Sertoli-Zellzahl beobachtet.
2. Die Methimazol-Behandlung führte ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der Sertoli-Zellzahl.
3. Bei den mit DEHP behandelten Tieren war auf Grund des Keimepithels eine Erkennung der Spermatogenese-Stadien nicht möglich.
4. Der Apoptosemarker BCL2 ist für die Untersuchung nach DEHP – bzw. nach Methimazolbehandlung nicht geeignet.
5. Das Fehlen der Cleaved-Caspase3-Reaktion in den sekundären Spermatozoen nach der DEHP-Behandlung weist wahrscheinlich auf eine Apoptose hin.

7. Anhang

Anhang: I Infoblatt der Herstellerfirma für Cleaved Caspase-3


Store at -20°C

#9664

## Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1) Rabbit mAb

Small 100 µl (10 Western mini-blots)

Large 300 ml (30 Western mini-blots)



**Orders** ■ 877-616-CELL (2355)  
orders@cellsignal.com

**Support** ■ 877-678-TECH (8324)  
info@cellsignal.com

**Web** ■ www.cellsignal.com

rev. 04/17/07

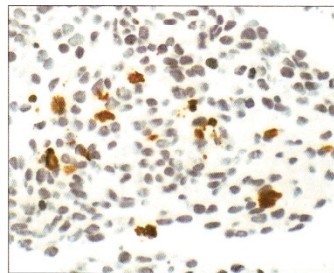
This product is for *in vitro* research use only and is not intended for use in humans or animals.

Applications	Species Cross-Reactivity	Molecular Wt.	Source
W, IP, IHC-P, IHC-F, IF-IC, F	H, M, R	17, 19 kDa	Rabbit*

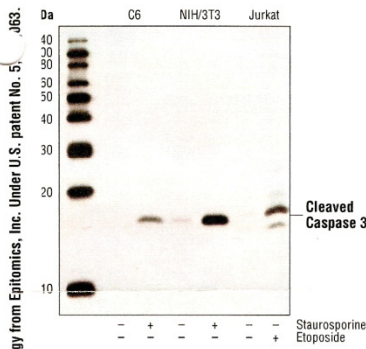
**Background:** Caspase-3 (CPP-32, Apoptain, Yama, SCA-1) is one of the key executioners of apoptosis, as it is either partially or totally responsible for the proteolytic cleavage of many key proteins such as the nuclear enzyme poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) (1). Activation of caspase-3 requires proteolytic processing of its inactive zymogen into activated p17 and p12 fragments. Cleavage of caspase-3 requires aspartic acid at the P1 position (2).

**Specificity/Sensitivity:** Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1) Rabbit mAb detects endogenous levels of the large fragment (17/19 kDa) of activated caspase-3 resulting from cleavage adjacent to Asp175. This antibody does not recognize full length caspase-3 or other cleaved caspases.

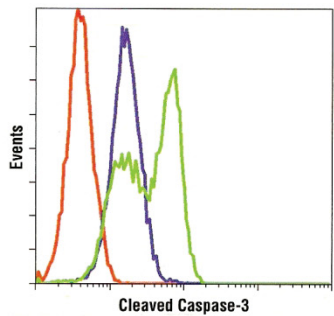
**Source/Purification:** Monoclonal antibody is produced by immunizing rabbits with a synthetic peptide (KLH-coupled) corresponding to amino-terminal residues adjacent to Asp175 of human caspase-3.



Immunohistochemical staining of paraffin-embedded mouse embryo, showing cytoplasmic localization in apoptotic cells, using Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1) Rabbit mAb.



Western blot analysis of extracts from C6 (rat), NIH/3T3 (mouse), and Jurkat (human) cells, untreated or treated with staurosporine or etoposide as indicated, using Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1) Rabbit mAb.



Flow cytometric analysis of Jurkat cells, untreated (blue) or etoposide-treated (green), using Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1) Rabbit mAb compared to a nonspecific negative control antibody (red).

**Background References:**

- (1) Fernandes-Alnemri, T. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 30761-30764.
- (2) Nicholson, D.W. et al. (1995) *Nature* 376, 37-43.

**IMPORTANT: For Western blots, incubate membrane with diluted antibody in 5% w/v nonfat dry milk, 1X TBS, 0.1% Tween-20 at 4°C with gentle shaking, overnight.**

**Applications Key:** W—Western IP—immunoprecipitation IHC—immunohistochemistry IC—immunocytochemistry IF—immunofluorescence  
**Species Cross-Reactivity Key:** H—human M—mouse R—rat Hm—hamster Mk—monkey Mi—mink C—chicken X—Xenopus  
 Species enclosed in parentheses are predicted to react based on 100% sequence homology.

**Storage:** Supplied in 10 mM sodium HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA and 50% glycerol. Store at -20°C. Do not aliquot the antibody.

**\*Anti-rabbit secondary antibodies must be used to detect this antibody**

**Recommended Antibody Dilutions:**

Western blotting	1:1000
Immunoprecipitation	1:100
Immunohistochemistry (Paraffin)	1:100
IHC Protocol	Citrate/PBST
Immunohistochemistry (Frozen)	1:200
Fixative:	10% Neutral buffered formalin
Immunofluorescence (IF-IC)	1:400
Flow Cytometry	1:100

**Companion Products:**

Phototope<sup>®</sup>-HRP Western Blot Detection System, Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7072

Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074

Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076

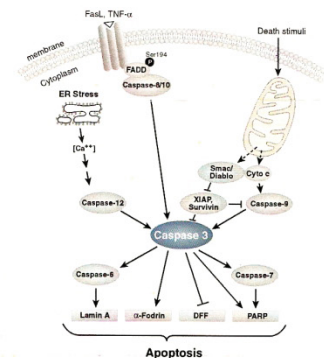
Prestained Protein Marker, Broad Range (Premixed Format) #7720

Biotinylated Protein Ladder Detection Pack #7727

20X LumiGLO<sup>®</sup> Reagent and 20X Peroxide #7003

Cleaved Caspase-3 (Asp175) Blocking Peptide #1050

Cleaved PARP (Asp214) Antibody (Human Specific) (Fluorescein Conjugate) #9547



Apoptosis/Caspase Signaling Pathway

F—Flow cytometry E—ELISA D—DELTA<sup>®</sup>  
 Z—zebra fish B—bovine All—all species expected

© 2007 Cell Signaling Technology, Inc. Rabbit Monoclonals Produced Using Technology from Eptitomics, Inc. Under U.S. patent No. 5,746,363.

page 1 of 7

## Anhang: II Infoblatt der Herstellerfirma für BCL2



**Monoclonal Mouse  
Anti-Human  
BCL2 Oncoprotein**  
Clone 124  
Code M0887



ENGLISH	
<b>Intended use</b>	For in vitro diagnostic use. Monoclonal Mouse Anti-Human BCL2 Oncoprotein, Clone 124, is intended for use in immunohistochemistry. The antibody labels cells expressing BCL2 oncoprotein. Positive results aid in the classification of follicular lymphomas and various diffuse lymphoproliferative diseases. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.
<b>Summary and explanation</b>	BCL2 oncoprotein is a blocker of apoptotic cell death. Gene transfer experiments have shown that elevated levels of this protein can protect a wide variety of cells from diverse cell death stimuli ranging from growth factor withdrawal and cytotoxic lymphokines to virus infection and DNA-damaging, anticancer drugs and radiation (2, 3). BCL2 oncoprotein resides on the cytoplasmic side of the mitochondrial outer membrane, endoplasmic reticulum and nuclear envelope (2, 4), and has a molecular mass of 26 kDa (3). The BCL2 gene is involved in the t(14;18) chromosomal translocation found in 85% of human follicular lymphomas and 20% of diffuse B-cell lymphomas (4). In this translocation, the BCL2 gene at chromosome segment 18q21 is juxtaposed with the Ig heavy chain locus at 14q32, resulting in deregulated expression of BCL2 oncoprotein (4).
<b>Reagent provided</b>	Monoclonal mouse antibody provided in liquid form as cell culture supernatant dialysed against 0.05 mol/L Tris/HCl, pH 7.2, and containing 15 mmol/L Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . <u>Clone:</u> 124 (1). <u>Isotype:</u> IgG1, kappa. <u>Mouse IgG concentration:</u> see label on vial. The protein concentration between lots may vary without influencing the optimal dilution. The titer of each individual lot is adjusted to ascertain comparable lot-to-lot immunohistochemical staining performance with a reference lot.
<b>Immunogen</b>	Synthetic peptide comprising amino acids 41-54 of human BCL2 oncoprotein (1).
<b>Specificity</b>	In Western blotting of extracts of normal human spleen (1, 5), t(14;18)-positive follicular lymphoma (1), and myeloid leukaemic cell lines (5) the antibody labels solely a band of 26 kDa, corresponding to BCL2 oncoprotein under both nonreducing (1) and reducing conditions (1, 5). The antibody labels the myeloid leukaemic cell lines, HL-60 (promyelocytic), KG1 (myeloblastic), GM-1 (monoblastic) and K562 (erythromyeloid) (5).
<b>Precautions</b>	1. For professional users. 2. This product contains sodium azide (NaN <sub>3</sub> ), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing. 3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used. 4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin. 5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
<b>Storage</b>	Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Services.
<b>Specimen preparation</b>	<u>Paraffin sections:</u> The antibody can be used for labelling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin or Bouin's (5). Pre-treatment of tissues with heat-induced epitope retrieval is required. For tissues fixed in formalin, optimal results are obtained with 10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. Less optimal results are obtained with Dako Target Retrieval Solution, High pH, code S3308, Dako Target Retrieval Solution, code S1700, or 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0. Pre-treatment of tissues with proteinase K was found inefficient. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. <u>Frozen sections and cell preparations:</u> The antibody can be used for labelling acetone-fixed, frozen sections and cell smears (1).
<b>Staining procedure</b>	<u>Dilution:</u> Monoclonal Mouse Anti-Human BCL2 Oncoprotein, code M0887, may be used at a dilution range of 1:50-1:100 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of tonsil tissue and using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in 10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0, and 30 minutes incubation at room temperature with the primary antibody. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined by each individual laboratory. The recommended negative control is Dako Mouse IgG1, code X0931, diluted to the same mouse IgG concentration as the primary antibody. Unless the stability of the diluted antibody and negative control has been established in the actual staining procedure, it is recommended to dilute these reagents immediately before use, or dilute in Dako Antibody Diluent, code S0809. Positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimen. <u>Visualization:</u> Dako LSAB™+HRP kit, code K0679, and Dako EnVision™+HRP kits, codes K4004 and K4006 are recommended. For frozen sections and cell preparations, the Dako APAAP kit, code K0670, is a good alternative if endogenous peroxidase staining is a concern. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit. <u>Automation:</u> The antibody is well suited for immunocytochemical staining using automated platforms, such as the Dako Autostainer.
<b>Performance characteristics</b>	Cells labelled by the antibody display a cytoplasmic staining pattern. <u>Normal tissues:</u> The antibody labels almost all peripheral blood lymphocytes. In lymphoid tissue, small lymphocytes in the mantle zones and T-cell areas are positive whereas very few cells in germinal centres are labelled. In the spleen, many cells in both T- and B-cell areas and the red pulp are labelled by the antibody. In the thymus, many cells in the medulla are labelled, while most cells in the cortex show weak or negative staining (1).

(104935-005)

M0887/EFG/KRM/2008.09.30 p. 1/4

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

## **Danksagung**

Für die Betreuung und Beratung bei dieser Arbeit möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Syed G. Haider bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Frau Gabriele Berthold für die Einarbeitung in histologische und immunhistochemische Vorgänge und Versuchsabläufe.

Nicht zu letzt bedanke ich mich bei Herrn Ralf Fassbender für Beratung und Unterstützung nicht nur beim fotografieren und erstellen der Abbildungen.



## Lebenslauf

---

30.07.1984

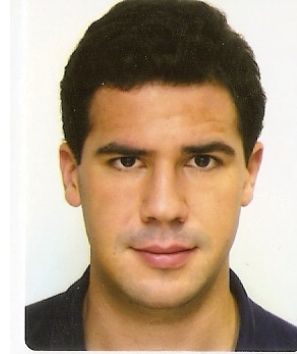
Jan Hendrik Busch, geboren in Dortmund,  
Sohn von Inge Dorothea Levin und Hans Jürgen Busch

01.08.1991 - 31.07.1995

Städtische Reichshof-Grundschule, Dortmund

01.08.1995 - 31.07.2004

Immanuel-Kant-Gymnasium, Dortmund, Abitur 2004



WS 2004/05 Immatrikulation Medizin-Studium, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

04.04.2007 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum)

SS 2007

Tutor in den Instituten für Physiologie zur Betreuung des Praktikums Physiologie für Mediziner

01.08.2007 - 02.09.2007

Famulatur Orthopädie und Traumatologie Krankenhaus Bethanien, Dortmund  
Leitung: Dr. J. Hagemeyer

03.09.2007 - 03.10.2007

Famulatur Radiologie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,  
Leitung Prof. Dr. G. Adam

25.02.2008 - 31.03.2008

Famulatur Orthopädie, Facharzt-Praxis für Orthopädie, Chirotherapie / Sportmedizin  
in Dortmund Leitung: Dr. A. Hannover

SS 2008

Molekulare Onkologie in der Chirurgie, PD Dr. med. Nikolas Hendrik Stoecklein

01.08.2008 - 31.08.2008

Famulatur Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Leitung: Prof. Dr. J.M. Rueger

22.02.2010 - 21.01.2011 Praktisches Jahr:

- Nepean Clinical School, University of Sydney, Australien
- Mater Dei Hospital, University of Malta
- Ev. Krankenhaus BETHESDA zu Duisburg akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Düsseldorf
- Kantonsspital St. Gallen akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Bern

Abschluss des Studiums Humanmedizin mit 2. Staatsexamen Oktober 2011

01.12.2011

Anstellung als Assistenzarzt in der Orthopädie im Bethanien Krankenhaus Dortmund

Jan Hendrik Busch

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 10.04.2012

Jan Hendrik Busch